



FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología
Área de Nutrición y Bromatología

DETERMINACIÓN DE ANIONES Y CATIONES EN LA MIEL MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR



Silvia Suárez Luque

Memoria presentada para optar al grado de Doctor
Universidad de Santiago de Compostela, noviembre 2009



D. JESÚS SIMAL LOZANO, Catedrático de Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela, **Dña. INÉS MATO NAVEIRA**, Doctora del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela y **D. JOSÉ FRANCISCO HUIDOBRO CANALES**, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

AUTORIZAN a Dña. SILVIA SUÁREZ LUQUE a presentar la memoria titulada “**Determinación de aniones y cationes en la miel mediante electroforesis capilar**” para optar al grado de Doctor, la cual ha sido realizada bajo nuestra dirección en el laboratorio del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que conste, se expide la presente en Santiago de Compostela, noviembre de 2009.

Fdo.: **Dr. D. Jesús Simal Lozano**

Fdo.: **Dra. Dña. Inés Mato Naveira**

Fdo.: **Dr. D. José Francisco Huidobro Canales**





*A mis padres
A Ancor*



Agradecimientos

Han sido tantos años de trabajo compartidos con tanta gente que me resulta difícil reflejar en unas líneas a todas las personas que me han ayudado de una manera u otra en la realización de este trabajo.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología el haberme proporcionado los medios necesarios que han permitido llevar a cabo esta Tesis Doctoral.

Agradezco a mis directores, Jesús Simal Lozano, Inés Mato Naveira y José Francisco Huidobro Canales su orientación, paciencia y apoyo durante todo este tiempo. En especial, me gustaría agradecer a Inés que caminase siempre a mi lado con sus conocimientos, alegría y comprensión.

A todos los profesores del Área de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia, por el interés mostrado durante el desarrollo de este trabajo y, en especial, al Prof. Dr. José María Creus Vidal por su ayuda y simpatía.

A la Profa. María Teresa Sancho Ortiz del Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos por toda su ayuda y por proporcionarnos las fotos de pólenes para la presentación de este trabajo.

Al Prof. Dr. Rafael Cela Torrijos del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química por sus valiosas orientaciones científicas y por su asesoramiento en el tratamiento estadístico de los datos.

Al Prof. Jesús Simal Gándara del Departamento de Química Analítica y Alimentaria de la Universidad de Vigo por la ayuda material y académica aportada.

Al Prof. Dr. Juan Carlos García Monteagudo del Departamento de Química Física de la Facultad de Farmacia y al Prof. José Luis Rodríguez Otero del

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela por el asesoramiento científico aportado.

A la Consellería de Educación y Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia, por la beca Predoctoral recibida.

A la Asociación Galega de Apicultores (AGA), en especial a José Manuel Durán Orus, por su interés en las investigaciones realizadas y a los envasadores de miel con “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” por habernos suministrado las muestras.

En todos estos años he compartido el Departamento con muchos compañeros que han pasado a ser buenos amigos. Me gustaría agradecer a todos su apoyo constante. En especial, al grupo de la miel: Cristina Álvarez, Cristina Martínez, Gloria, Sandra, Pilar, Mercedes y Ángel con los que he compartido grandes momentos.

Muchas gracias a mis padres Isabel y Daniel y a mis hermanas Isa y Betty porque, aunque se encuentren lejos físicamente, siempre están a mi lado con su cariño.

A Carmen, Foro, Carmola y Iago por su ayuda incondicional y por hacerme un hueco a su lado.

A La Mamma porque solamente con una sonrisa me da la fuerza y el apoyo necesario en cada momento.

A Ancor, porque a su lado soy mejor persona y porque sin sus ánimos y su confianza no habría sido posible este trabajo. También me gustaría agradecerle las fotos que adornan este trabajo que ha hecho con todo su cariño.

Me gustaría agradecer a todos mis familiares, amigos y compañeros de trabajo que han sabido escucharme y apoyarme en todo este tiempo.

A los que estuvieron, a los que están y a los que estarán, a todos ellos, gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVII
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 MIEL.....	4
1.1.1 Definición.....	4
1.1.2 Tipos.....	4
1.1.2.1 Según origen botánico.....	4
1.1.2.2 Según presentación.....	4
1.1.2.3 Según método de elaboración.....	5
1.1.2.4 Según destino.....	5
1.1.3 Origen.....	5
1.1.4 Etapas del procesado de la miel.....	8
1.1.4.1 La castra.....	10
1.1.4.2 Desoperculación.....	10
1.1.4.3 Extracción.....	10
1.1.4.4 Filtración.....	11
1.1.4.5 Decantación.....	11
1.1.4.6 Envasado.....	12
1.1.5 Utilización.....	12
1.1.6 Estado actual de la apicultura.....	13
1.1.7 Composición química.....	15
1.1.8 Factores esenciales de composición y calidad.....	17
1.2 MINERALES.....	19
1.3 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS RELACIONADOS CON LOS MINERALES.....	20
1.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

2 OBJETO DEL TRABAJO.....	25
3 MUESTRAS.....	29
3.1 ORIGEN BOTÁNICO Y GEOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS DE MIEL.....	31
3.1.1 Origen botánico de las muestras.....	34
3.1.2 Origen geográfico de las mieles.....	34
3.1.2.1 Comunidad autónoma de procedencia del envasador.....	34
3.1.2.2 Mielles gallegas clasificadas según la provincia de procedencia del envasador.....	34
3.2 CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	35
3.3 TOMA DE MUESTRA.....	35
3.3.1 Homogeneización.....	35
3.3.2 Licuación.....	35
3.3.3 Limpieza.....	36
3.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
4 PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS.....	39
4.1 COLOR.....	41
4.1.1 Antecedentes bibliográficos.....	41
4.1.2 Parte experimental.....	45
4.1.2.1 Material y aparatos.....	45
4.1.2.2 Procedimiento.....	45
4.1.2.3 Cálculos y expresión de resultados.....	46
4.1.2.3.1 <i>Parámetros del color</i>	46
4.1.2.3.1.1 <i>Coordenadas tricromáticas</i>	46
4.1.2.3.1.2 <i>Absorbancia neta</i>	46
4.1.2.3.1.3 <i>Turbidez</i>	46
4.1.2.3.1.4 <i>Precisión</i>	47
4.1.2.3.2 <i>Cromaticidad</i>	47
4.1.3 Resultados y discusión.....	47
4.1.3.1 Métodos.....	47
4.1.3.1.1 <i>Determinación de la longitud de onda dominante</i>	47

4.1.3.2 Muestras.....	49
4.1.3.2.1 Resultados obtenidos según el origen botánico.....	52
4.1.3.2.2 Resultados obtenidos según el origen geográfico de procedencia del envasador.....	54
4.2 CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA.....	56
4.2.1 Antecedentes bibliográficos.....	56
4.2.2 Parte experimental.....	57
4.2.2.1 Fundamento.....	57
4.2.2.2 Material y aparatos.....	57
4.2.2.3 Reactivos.....	57
4.2.2.4 Procedimiento.....	57
4.2.2.5 Cálculos y expresión de resultados.....	57
4.2.2.6 Precisión.....	58
4.2.3 Resultados y discusión.....	58
4.2.3.1 Comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los publicados por otros autores.....	59
4.2.3.2 Resultados obtenidos según el origen botánico de las mieles...	60
4.2.3.3 Resultados obtenidos según el origen geográfico de procedencia del envasador de las muestras de miel.....	61
4.3 pH.....	63
4.3.1 Antecedentes bibliográficos.....	63
4.3.2 Parte experimental.....	63
4.3.2.1 Fundamento.....	63
4.3.2.2 Material y aparatos.....	64
4.3.2.3 Procedimiento.....	64
4.3.2.4 Precisión.....	64
4.3.3 Resultados y discusión.....	64
4.3.3.1 Comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los publicados por otros autores.....	65
4.3.3.2 Resultados obtenidos según el origen botánico de las mieles...	66
4.3.3.3 Resultados obtenidos según el origen geográfico de procedencia del envasador de las muestras de miel.....	67

4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
5 MINERALES.....	81
5.1 ELECTROFORESIS CAPILAR.....	83
5.1.1 Instrumentación.....	83
5.1.2 Tipos de separación.....	85
5.1.3 Electroforesis Capilar en Zona (CZE).....	86
5.1.4 Electroforesis capilar aplicada a la miel.....	90
5.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	91
5.2.1 Métodos gravimétricos, volumétricos, colorimétricos y turbidimétricos.....	92
5.2.2 Métodos espectroscópicos.....	92
5.2.2.1 Espectroscopía de absorción atómica (AAS).....	94
5.2.2.2 Espectroscopía de emisión atómica (AES).....	97
5.2.2.2.1 Espectroscopía de emisión atómica de llama (F-AES).....	97
5.2.2.2.2 Espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES).....	99
5.2.2.2.3 Espectroscopía de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES).....	101
5.2.2.2.4 Espectroscopía por plasma de acoplamiento inductivo a espectrometría de masas (ICP-MS).....	102
5.2.2.3 Espectroscopía de fluorescencia con reflexión total de rayos X (TXRF).....	104
5.2.3 Métodos cromatográficos.....	105
5.2.4 Electroforesis capilar.....	106
5.3 DETERMINACIÓN DE CATIONES MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR.....	107
5.3.1 Parte experimental.....	107
5.3.1.1 Material y aparatos.....	107
5.3.1.2 Reactivos.....	107
5.3.1.3 Procedimiento de trabajo.....	107
5.3.1.3.1 Preparación de las disoluciones patrón.....	107
5.3.1.3.2 Preparación de la muestra.....	108

5.3.1.3.3 Condiciones electroforéticas.....	108
5.3.1.3.3.1 Preparación del electrolito.....	108
5.3.1.3.3.2 Acondicionamiento del capilar.....	108
5.3.1.3.3.3 Lavado del capilar.....	109
5.3.1.3.3.4 Condiciones de separación.....	109
5.3.2 Resultados y discusión.....	110
5.3.2.1 Aplicación del método en muestras de miel.....	110
5.3.2.1.1. Puesta a punto del método.....	111
5.3.2.1.1.1 Condiciones electroforéticas.....	111
5.3.2.1.1.1.1 Composición del electrolito.....	111
a) Efecto de la concentración de imidazol.....	112
b) Influencia del agente complejante en la composición del electrolito.....	113
c) Selección del pH del electrolito.....	113
5.3.2.1.1.1.2 Efecto del voltaje de migración.....	114
5.3.2.1.1.1.3 Influencia de la temperatura.....	114
5.3.2.1.1.2 Tiempos de migración.....	114
5.3.2.1.1.3 Límites de detección y cuantificación.....	116
5.3.2.1.1.4 Curvas de calibrado.....	117
5.3.2.1.1.5 Precisión.....	117
5.3.2.1.1.5.1 Tiempos de migración.....	118
5.3.2.1.1.5.2 Concentración de cationes.....	119
5.3.2.1.1.6 Exactitud.....	120
5.3.2.1.2 Contenido en cationes de las muestras analizadas.....	121
5.3.2.1.2.1 Comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los publicados por otros autores.....	123
5.3.2.1.2.2 Resultados obtenidos según el origen botánico de las mieles.....	125
5.3.2.1.2.3 Resultados obtenidos según el origen geográfico del envasador de las muestras de miel.....	126
5.3.2.2 Aplicación de este método en otros tipos de muestras.....	129
5.3.2.2.1 Bebidas.....	129
5.3.2.2.2 Leche.....	129

5.4 DETERMINACIÓN DE ANIONES MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR	130
5.4.1 Parte experimental	130
5.4.1.1 Material y aparatos	130
5.4.1.2 Reactivos	130
5.4.1.3 Procedimiento de trabajo	130
5.4.1.3.1 Preparación de las disoluciones patrón	130
5.4.1.3.2 Preparación de la muestra	130
5.4.1.3.3 Condiciones electroforéticas	130
5.4.1.3.3.1 Preparación del electrolito	130
5.4.1.3.3.2 Acondicionamiento del capilar	131
5.4.1.3.3.3 Lavado del capilar	131
5.4.1.3.3.4 Condiciones de separación	131
5.4.2 Resultados y discusión	131
5.4.2.1 Puesta a punto del método	132
5.4.2.1.1. Condiciones electroforéticas	132
5.4.2.1.1.1 Composición del electrolito	132
a) Efecto de la concentración de cromato	133
b) Selección del supresor del flujo electroosmótico	133
5.4.2.1.2 Tiempos de migración	134
5.4.2.1.3 Límites de detección y cuantificación	134
5.4.2.1.4 Curvas de calibrado	134
5.4.2.1.5 Precisión	135
5.4.2.1.6 Exactitud	136
5.4.2.2 Contenido en aniones de las muestras de miel	137
5.4.2.2.1 Comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los publicados por otros autores	139
5.4.2.2.2 Resultados obtenidos según el origen botánico de las muestras	140
5.4.2.2.3 Resultados obtenidos según el origen geográfico del envasador de las muestras de miel	142
5.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144

6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	159
6.1 RELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS.....	161
6.1.1 Antecedentes bibliográficos.....	161
6.1.2 Análisis de relaciones mediante regresión lineal.....	162
6.1.2.1 Relaciones entre los parámetros físico químicos.....	162
6.1.2.2 Relaciones entre los parámetros físico químicos y el contenido mineral.....	163
6.1.2.3 Relaciones entre los componentes minerales de las muestras de miel analizadas.....	165
6.2 ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	167
6.2.1 Antecedentes bibliográficos.....	167
6.2.2 Análisis estadístico multivariante.....	170
6.2.2.1 Análisis de componentes principales.....	171
6.2.2.2 Análisis lineal discriminante.....	174
6.2.2.2.1 <i>Análisis lineal discriminante en función del origen botánico de las muestras de miel.....</i>	<i>174</i>
6.2.2.2.2 <i>Análisis lineal discriminante teniendo en cuenta la comunidad autónoma de procedencia del envasador de las muestras de miel.....</i>	<i>175</i>
6.2.2.2.3 <i>Análisis lineal discriminante para diferenciar las mieles de Galicia con “Indicación Xeográfica Protexida-Mel de Galicia” de las procedentes de otras comunidades autónomas.....</i>	<i>176</i>
6.2.2.2.4 <i>Análisis lineal discriminante de las mieles de Galicia con “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” en función de la provincia del envasador.....</i>	<i>178</i>
6.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179
 7 CONCLUSIONES.....	 187
 ANEXOS.....	 193



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AAS	Espectroscopía de absorción atómica
ACS	American Chemical Society
AES	Espectroscopía de emisión atómica
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BOE	Boletín Oficial del Estado
CE	Capillary Electrophoresis (Electroforesis capilar)
CEC	Capillary Electrochromatography (Electrocromatografía capilar)
CGE	Capillary Gel Electrophoresis (Electroforesis capilar en gel)
CIA	Capillary Ion Analyzer
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage
CIEF	Capillary Isoelectric Focusing (Isoelectroenfoque capilar)
CITP	Capillary Isotachophoresis (Isotacoforesis capilar)
CZE	Capillary Zone Electrophoresis (Electroforesis capilar en zona)
DOCE	Diario Oficial de las Comunidades Europeas
DOCM	Diario Oficial de Castilla-La Mancha
DOE	Diario Oficial de Extremadura
DOG	Diario Oficial de Galicia
Ed.	Editorial
EOF	Electroosmotic Flow (Flujo electroosmótico)
et al.	<i>et alii</i> (y otros)
ET-AAS	Espectroscopía de absorción atómica electrotérmica
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
Fig.	Figura
F-AAS	Espectroscopía de absorción atómica de llama

FRX	Espectroscopía de fluorescencia de rayos X con excitación de radioisótopos
GC	Gas Chromatography (Cromatografía gaseosa)
HDE	Número de elementos de mielada
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
IC	Ionic Chromatography (Cromatografía iónica)
ICP-AES	Espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo
ICP-MS	Espectroscopía de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo a espectrometría de masas
ICP-OES	Espectroscopía de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo
ID	Internal Diameter (Diámetro interno)
ISO	International Organization for Standardization
L	Linneo
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
M	Molar
mM	Milimolar
MARM	Ministerio de Medioambiente y Medio Rural y Marino
MECC o MEKC	Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (Cromatografía capilar electrocinética micelar)
meq	Miliequivalente
min.	Minuto
MS	Mass Spectrometry (Espectrometría de masas)
n	Número de muestras
NC	No cuantificable
ND	No detectable
PG	Granos de polen
pp	Páginas
q/r	Carga/radio
r	Coefficiente de correlación lineal

rpm	Revoluciones por minuto
Rev.	Revisión
sp.	Especie
RSD%	Relative Standard Deviation (Desviación estándar relativa, en tanto por ciento)
SDC	Síndrome de desaparición
tm	Tiempo de migración
TEPA	Tetraetilenpentamina
TXRF	Espectroscopía de fluorescencia con reflexión total de rayos X
Vol.	Volumen
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
V_{máx}	Valor máximo
V_{mín}	Valor mínimo

No se incluyen las abreviaturas correspondientes al Sistema Internacional de Unidades (Decreto 1257/74, de 25 de abril de 1974, publicado en el BOE N° 110 de 08/05/1974), ni las estadísticas ni las interpretables por su contexto.



ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla 1.1	Producción mundial de miel en 2007.....	13
Tabla 1.2	Composición promedio y rango de algunos componentes de la mieles florales y de mielada.....	16
Tabla 1.3	Criterios de calidad de la miel en la reglamentación actual y en la “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia”.....	18

CAPÍTULO 3 MUESTRAS

Tabla 3.1	Muestras de miel analizadas en este trabajo.....	32
------------------	--	----

CAPÍTULO 4 PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS

Tabla 4.1	Características de la revisión sistemática realizada en relación con los métodos de determinación del color en la miel.....	43
Tabla 4.2	Técnicas de determinación del color en la miel.....	44
Tabla 4.3	Análisis estadístico en el que se comparan los resultados obtenidos al calcular la longitud de onda dominante gráficamente o mediante la fórmula propuesta por <i>Heredia y Guzmán (1992)</i> ...	49
Tabla 4.4	Resultados de color obtenidos para el total de las muestras analizadas.....	51
Tabla 4.5	Resultados obtenidos por otros autores que utilizan técnicas espectrofotométricas para la determinación del color en muestras de miel.....	52
Tabla 4.6	Parámetros del color en las muestras analizadas agrupadas según su origen botánico.....	53

Tabla 4.7	Parámetros del color en las muestras analizadas agrupadas según su comunidad autónoma de origen.....	54
Tabla 4.8	Conductividad eléctrica de las mieles determinadas por otros autores y clasificadas según su país de origen. Se muestra el contenido mínimo y máximo en mS/cm.....	59
Tabla 4.9	Conductividad eléctrica de las muestras analizadas agrupadas según su origen botánico.....	60
Tabla 4.10	Conductividad eléctrica de las muestras analizadas agrupadas según la comunidad autónoma de procedencia del envasador.....	61
Tabla 4.11	Valores de pH de las mieles determinadas por otros autores y clasificadas según su país de origen. Se muestran los contenidos mínimo y máximo.....	65
Tabla 4.12	Valores de pH de las muestras analizadas agrupadas según su origen botánico.....	66
Tabla 4.13	Valores de pH de las muestras analizadas agrupadas según la comunidad autónoma de procedencia del envasador.....	67

CAPÍTULO 5 MINERALES

Tabla 5.1	Características de la búsqueda sistemática realizada en relación con los métodos de determinación de los minerales en la miel.....	91
Tabla 5.2	Métodos de determinación de minerales en miel mediante espectroscopía de absorción atómica.....	95
Tabla 5.3	Métodos de determinación de minerales en miel mediante espectroscopía de emisión atómica.....	98
Tabla 5.4	Métodos de determinación de minerales en miel mediante ICP-AES.....	100
Tabla 5.5	Métodos de determinación de minerales en miel mediante ICP-OES.....	101
Tabla 5.6	Métodos de determinación de minerales en la miel mediante cromatografía iónica.....	105
Tabla 5.7	Condiciones de separación del método de electroforesis capilar utilizado para la determinación de los cationes en este trabajo.....	109

Tabla 5.8	Límites de detección y cuantificación y coeficientes de correlación (r) de las rectas de calibrado de los cationes analizados.....	116
Tabla 5.9	Resultados de precisión (RSD%) del método propuesto para los tiempos de migración absolutos y relativos.....	118
Tabla 5.10	Resultados de precisión (RSD%) del método propuesto para la concentración de las muestras.....	119
Tabla 5.11	Recuperaciones obtenidas mediante el método de las adiciones estándar para los cationes analizados y valores de p del estudio de comparación de las pendientes de las rectas de regresión obtenidas al estudiar el efecto matriz.....	120
Tabla 5.12	Contenido de los cationes (mg/kg) obtenido para el total de las muestras de miel analizadas.....	121
Tabla 5.13	Contenido en cationes de las mieles determinadas por otros autores y clasificadas según su país de origen. Se muestran los contenidos mínimo y máximo en mg/kg.....	124
Tabla 5.14	Contenido en cationes (mg/kg) de las muestras de miel analizadas agrupadas según su origen botánico.....	125
Tabla 5.15	Contenido en cationes (mg/kg) de las muestras de miel analizadas agrupadas según la comunidad autónoma de procedencia del envasador.....	127
Tabla 5.16	Condiciones de separación del método de electroforesis capilar utilizado para la determinación de los aniones en este trabajo.....	131
Tabla 5.17	Límites de detección y cuantificación (mg anión/kg miel) y coeficientes de correlación (r) de las rectas de calibrado de los aniones analizados.....	134
Tabla 5.18	Resultados de precisión (RSD%) del método propuesto.....	135
Tabla 5.19	Recuperaciones obtenidas mediante el método de las adiciones estándar para los aniones analizados y valores de p del estudio de comparación de las pendientes de las rectas de regresión obtenidas al estudiar el efecto matriz.....	136
Tabla 5.20	Contenido de los aniones (mg/kg) obtenido para el total de las muestras de miel analizadas.....	137

Tabla 5.21	Contenido en aniones de las mieles analizadas por otros autores y clasificadas según su país de origen. Se muestran los contenidos mínimo y máximo en mg/kg.....	139
Tabla 5.22	Contenido en aniones (mg/kg) de las muestras de miel analizadas agrupadas según su origen botánico.....	140
Tabla 5.23	Contenido en aniones (mg/kg) de las muestras de miel analizadas agrupadas según la comunidad autónoma de procedencia del envasador.....	142

CAPÍTULO 6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 6.1	Correlaciones lineales significativas a un nivel de confianza del 99,9% y con un r superior a 0,600 entre los parámetros físico químicos analizados.....	163
Tabla 6.2	Correlaciones lineales significativas a un nivel de confianza del 99,9% entre los parámetros físico químicos y el contenido mineral de las muestras analizadas.....	163
Tabla 6.3	Correlaciones lineales significativas a un nivel de confianza del 99,9% entre los diferentes componentes del contenido mineral de las muestras analizadas.....	165
Tabla 6.4	Estudios en los que se han utilizado técnicas multivariantes con el objeto de caracterizar las muestras de miel según su origen botánico, origen geográfico y ambos.....	168
Tabla 6.5	Pesos de los diferentes parámetros en cada una de las componentes principales.....	173
Tabla 6.6	Resultados de clasificación mediante el análisis lineal discriminante realizado.....	175
Tabla 6.7	Clasificación de las muestras de miel mediante el modelo obtenido.....	176
Tabla 6.8	Funciones de clasificación de las muestras obtenidas en el modelo que identifica las mieles gallegas.....	177
Tabla 6.9	Clasificación de las muestras de miel mediante el modelo obtenido que agrupa las muestras según la provincia de procedencia del envasador.....	178

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1.1	Pintura rupestre donde se representa a una mujer recolectando la miel de las abejas.....	3
Figura 1.2	Miel líquida.....	4
Figura 1.3	Localización de los nectarios en la flor de colza.....	6
Figura 1.4	Formación del mielato.....	7
Figura 1.5	Abeja libando el néctar de una flor silvestre.....	7
Figura 1.6	Abejas depositando la mezcla melífera en las celdillas del panal	8
Figura 1.7	Esquema del procesado de la miel.....	9
Figura 1.8	Proporción de la producción de miel en España en el 2007.....	15
Figura 1.9	Logotipo de la “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia”.....	15

CAPÍTULO 4 PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS

Figura 4.1	Diagrama de cromaticidad de la Commission Internationale de l'Eclaraige.....	48
Figura 4.2	Distribución de los parámetros del color y la turbidez en las muestras de miel analizadas.....	50
Figura 4.3	Parámetros del color en las muestras gallegas analizadas clasificadas según la provincia del envasador.....	55
Figura 4.4	Distribución de la conductividad eléctrica en las muestras de miel analizadas.....	58
Figura 4.5	Conductividad eléctrica de las muestras gallegas analizadas agrupadas según el origen geográfico del envasador.....	62
Figura 4.6	Distribución del pH en las muestras de miel analizadas.....	64

Figura 4.7	Valores de pH de las muestras gallegas analizadas agrupadas según el origen geográfico del envasador.....	68
-------------------	---	----

CAPÍTULO 5 MINERALES

Figura 5.1	Representación esquemática de la instrumentación básica de la electroforesis capilar.....	85
Figura 5.2	Movimiento del flujo electroosmótico (EOF) y movilidad de aniones y cationes en el interior de un capilar de sílice fundida con una fuente de alimentación.....	88
Figura 5.3	Electroferograma de una mezcla de cationes separados mediante el método de electroforesis capilar propuesto en este trabajo.....	110
Figura 5.4	Electroferograma de los cationes analizados mediante el método propuesto en dos muestras de miel, una de <i>Eucalyptus</i> sp. (A) y otra de <i>Castanea sativa</i> Miller (B).....	111
Figura 5.5	Efecto de la concentración de imidazol en los tiempos de migración de los cationes (ácido acético 1 M hasta pH 3,60, 25 kV, 25°C).....	112
Figura 5.6	Efecto del pH del electrolito en la separación de los cationes (imidazol 10 mM y ácido acético, 25 kV, 25°C).....	113
Figura 5.7	Efecto del voltaje en la separación de los cationes (imidazol 10 mM y ácido acético 1 M hasta pH 3,60, 25°C).....	114
Figura 5.8	Variación de los tiempos de migración absolutos y relativos respecto al bario de los cationes objeto de estudio con respecto al voltaje aplicado (kV).....	115
Figura 5.9	Distribuciones del contenido de los cationes determinados en las mieles analizadas.....	122
Figura 5.10	Distribución del contenido en cationes (mg/kg) de las muestras gallegas analizadas agrupadas según la provincia de origen del envasador.....	128
Figura 5.11	Electroferogramas de los aniones determinados mediante el método propuesto en dos muestras de miel, una de <i>Eucalyptus</i> sp. (A) y otra de <i>Castanea sativa</i> Miller (B).....	132

Figura 5.12	Distribuciones del contenido de los aniones determinados en las mieles analizadas.....	138
Figura 5.13	Contenido en aniones (mg/kg) de las muestras gallegas analizadas agrupadas según la provincia de origen del envasador.....	143

CAPÍTULO 6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Figura 6.1	Representación gráfica de la correlación que existe entre la conductividad eléctrica y el contenido mineral total.....	164
Figura 6.2	Representación gráfica de la correlación que existe entre la conductividad eléctrica y el contenido mineral total excluyendo los valores anómalos.....	164
Figura 6.3	Gráfica de sedimentación obtenida al llevar a cabo el análisis de componentes principales en las mieles y con los parámetros objeto este trabajo.....	172
Figura 6.4	Gráfico de dispersión obtenido al llevar a cabo el análisis lineal discriminante para diferenciar las mieles gallegas de las procedentes de otras comunidades autónomas.....	176



Introducción general



CAPÍTULO 1
Introducción general



La miel es un alimento que elaboran las abejas desde hace 20 millones de años, mucho antes de que existiera el hombre. Su utilización en la alimentación humana se remonta a la prehistoria como demuestran las pinturas rupestres de la Cueva de la Araña en Bicorp (Valencia) que datan del Paleolítico (Fig. 1.1).



Figura 1.1 Pintura rupestre donde se representa a una mujer recolectando la miel de las abejas (Azcoytia, 2008).

El hombre puede suministrar las mejores prácticas agronómicas, pero no logra obtener cosechas abundantes si olvida asegurar la polinización que las abejas realizan cuando van de flor en flor para recoger el néctar. Esta polinización es el principal beneficio de la apicultura (McGregor, 1979). Se estima que una colmena de abejas recorre unos 267.000 Km para producir un kilogramo de miel (White, 1978).

Otros beneficios de la apicultura, además de la producción de miel, son la obtención del polen, de la jalea real, de los propóleos, de la cera y hasta de su veneno (Schmidt y Buchmann, 1992).

1.1 MIEL

1.1.1 Definición



Figura 1.2 Miel líquida
(MAPA, 2006).

Se entiende por miel la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas, de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de las plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure (BOE, 2003) (Fig. 1.2).

1.1.2 Tipos

Existen numerosos tipos de miel que se pueden clasificar de diferentes formas. Algunas de ellas se describen a continuación (Codex Alimentarius, 2001; DOCE, 2002; BOE, 2003).

1.1.2.1 Según origen botánico

- ⇒ **Miel de flores**, obtenida principalmente de los néctares de las plantas. Se distinguen dos tipos: *unifloral o monofloral* cuando la miel procede del origen indicado en su mayor parte y posea sus características organolépticas, físico químicas y microscópicas y *miel multifloral, polifloral o milfloral* cuando en la mezcla de pólenes no existe una especie floral predominante.
- ⇒ **Miel de mielada**, la cual procede en su mayor parte de excreciones de insectos chupadores de plantas (hemípteros) presentes en las partes vivas de las mismas o de secreciones de estas partes vivas de las plantas. Su color varía del pardo claro o verdoso hasta casi negro.

1.1.2.2 Según presentación

- ⇒ **Miel**, producto en estado líquido, cristalizado o una mezcla de ambos.
- ⇒ **Miel en panal**, es la almacenada por las abejas en alvéolos operculados de panales recién contruidos por ellas mismas, que no contengan larvas y vendida en panales enteros cerrados o en secciones de estos panales.
- ⇒ **Miel con trozos de panal**, la cual contiene uno o más trozos de panales, exentos de larvas.

1.1.2.3 Según método de elaboración

- ⇒ **Miel decantada, escurrida o de gota**, obtenida mediante la decantación de los panales desoperculados que no contengan larvas.
- ⇒ **Miel centrifugada**, obtenida mediante la centrifugación de los panales desoperculados sin larvas.
- ⇒ **Miel prensada**, que procede de la compresión de los panales sin larvas, con aplicación opcional de calor moderado (máximo 45°C).
- ⇒ **Miel filtrada**, que se obtiene eliminando la materia orgánica o inorgánica ajena a la miel de tal manera que se genera una importante eliminación de polen.
- ⇒ **Miel cremosa**, la cual tiene una apariencia untuosa obtenida por un proceso físico de cristalización provocado y controlado.

1.1.2.4 Según destino

- ⇒ **Miel para consumo directo.**
- ⇒ **Miel para uso industrial**, miel que puede presentar un sabor y olor extraño, no característico, fermentación o sobrecalentamiento. Por estas razones, no cumple las exigencias citadas para la miel destinada a consumo directo en cuanto a contenido en enzimas, hidroximetilfurfural y humedad. Esta miel puede ser apropiada para usos industriales o para su utilización como ingrediente de otros productos alimenticios que se elaboran ulteriormente.

1.1.3 Origen

Existen dos fuentes principales de las que procede la miel: el néctar y el mielato.

El **néctar** se genera a partir de la savia en unas glándulas especializadas de las plantas llamadas nectarios (Fig. 1.3), situadas generalmente en la base de la corola de las flores (*Piana et al., 1989*). Se compone de una solución acuosa de varios azúcares cuyo contenido varía entre el 4 y el 70% dependiendo de la especie botánica y de las condiciones climáticas y edáficas. En la flora de nuestro entorno este porcentaje es del 40% (*Gonnet, 1982; Louveaux, 1985*).

El néctar contiene además pequeñas cantidades de otras sustancias como **sales minerales**, ácidos orgánicos, aminoácidos, enzimas, vitaminas, sustancias aromáticas, etc.

Se clasifica en tres grupos en función del azúcar que predomine en su composición: néctar con predominio de sacarosa, néctar en el que existe una mezcla equilibrada de sacarosa, fructosa y glucosa y néctar en el que existe igual proporción de fructosa y glucosa o con predominio de uno de estos azúcares (Louveaux, 1985).



Figura 1.3 Localización de los nectarios en la flor de colza (Gonnet, 1982).

El **mielato** es producido por numerosos insectos hemípteros que se caracterizan por poseer una estructura bucal que les permite succionar la savia que, posteriormente, pasa a través del conducto digestivo del insecto y en él sufre diferentes transformaciones siendo expulsada en forma de pequeñas gotas sobre el vegetal. Este mielato será recogido por la abeja y transformado en miel de mielada o mielato (Fig. 1.4). Su composición se basa principalmente en azúcares presentando mayor cantidad de **sales minerales** y aminoácidos que el néctar (Maurizio, 1979).

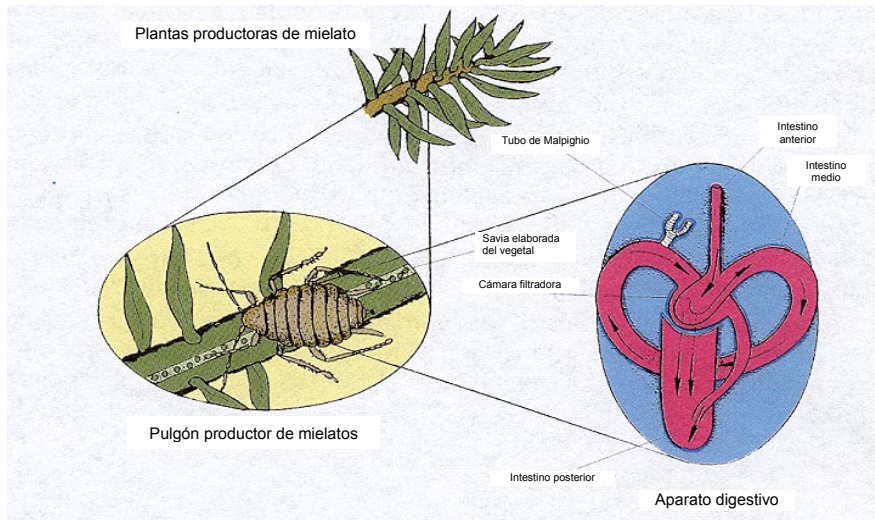


Figura 1.4 Formación del mielato (Robles y Salvachúa, 1999).

Durante la primavera y el verano las abejas pecoreadoras liban el néctar y/o mielato y lo transportan en el saco mielario donde lo mezclan con la saliva y con secreciones glandulares de la abeja ricas en enzimas cuyo fin es transformar los azúcares (Root, 1976; Piana et al., 1989) (Fig. 1.5).



Figura 1.5 Abeja libando el néctar de una flor silvestre (Foto realizada por José Manuel Durán Orus para la Asociación Galega de Apicultores).

Al volver a la colmena, después de una tarea que suele durar de sol a sol y tras recorrer muchos kilómetros, la abeja regurgita el contenido de sus buches

en las bocas de otras abejas obreras (entre 3-10 transferencias), enriqueciéndose de sustancias segregadas por cada abeja y sufriendo transformaciones químicas (Root, 1976; Piana et al., 1989).

Antes de depositar la mezcla melífera en la celdilla, la abeja rebaja su contenido en agua hasta un 40-50%. En este momento, la mezcla se considera miel no madura (Fig. 1.6). La miel se considerará madura después de varios procesos bioquímicos y del proceso físico de evaporación llevado a cabo por las abejas al agitar sus alas, de manera que su contenido en agua sea del 18% aproximadamente. La celdilla donde se deposita la miel se cierra con un opérculo de cera hermético para impedir su contacto con el aire y la captación de humedad que podría causar la fermentación. La miel permanece, en estas condiciones, en las celdas del panal hasta que es recogida por el apicultor o por las mismas abejas para su propia alimentación (Root, 1976; Piana et al., 1989).



Figura 1.6 Abejas depositando la mezcla melífera en las celdillas del panal (USDA, 2009).

1.1.4 Etapas del procesado de la miel

La miel es un producto alimenticio por lo que requiere una higiene muy rigurosa. Este alimento tiende a absorber del ambiente tanto la humedad como los olores y a retener polvo u otro material con el que llegue a estar en contacto. Por ello, durante su procesado, la miel no deberá estar en contacto con el cuerpo humano, con metales que puedan reaccionar con ella, ni con cualquier otro tipo de sustancia contaminante y/o polucionante (Piana et al., 1989).

En la obtención de la miel se distinguen las etapas que se muestran en la Figura 1.7 y que se comentan a continuación (Piana et al., 1989).

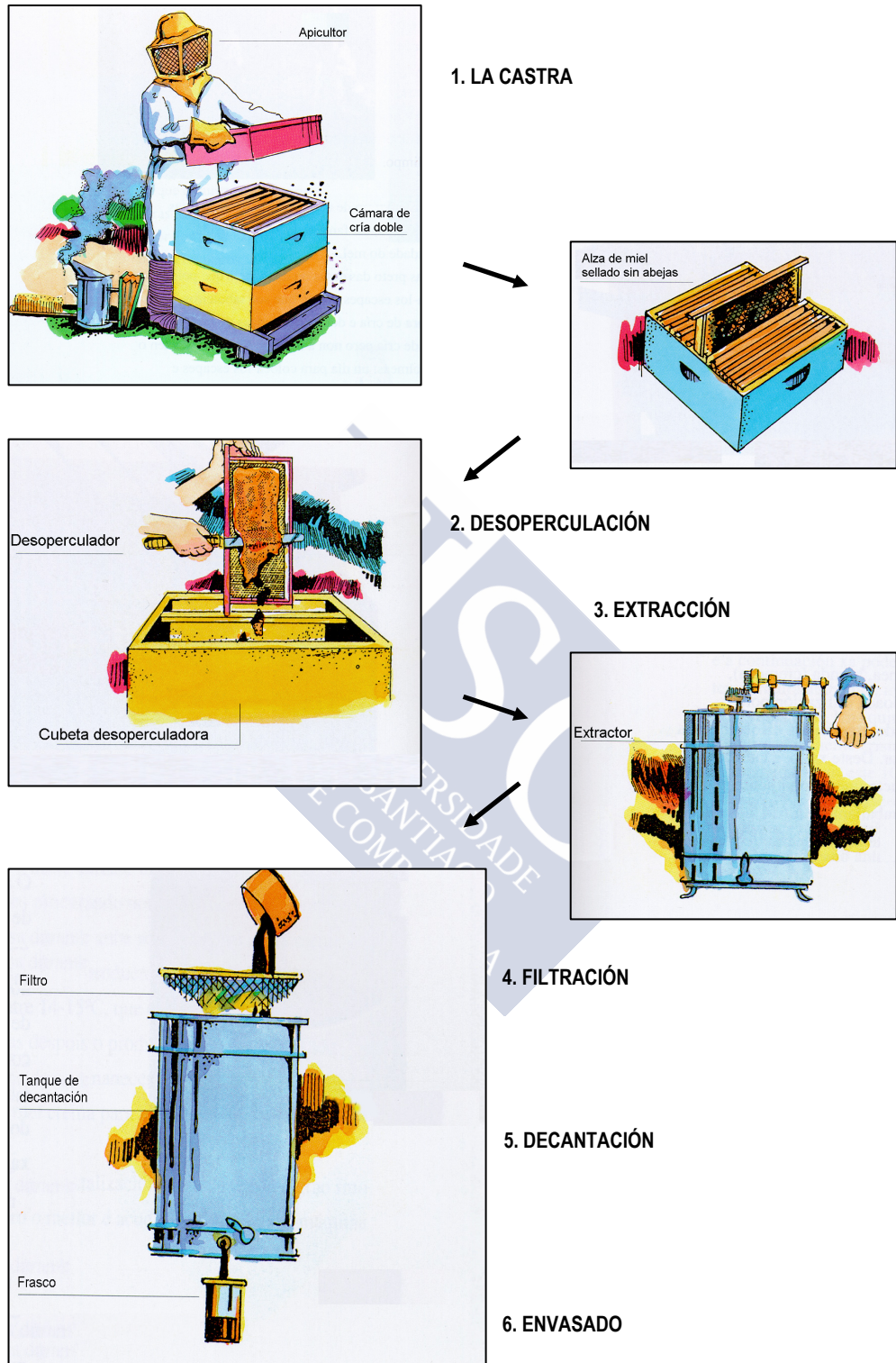


Figura 1.7 Esquema del procesado de la miel (AGA, 1998).

1.1.4.1 La castra

La miel estará madura si se encuentra en celdas operculadas o bien tres o cuatro días después del final de la floración dominante en la zona de pecoreo. En nuestro entorno, suele ser entre los meses de julio y septiembre. Como regla general se aconseja recoger los cuadros y sustituirlos por otros vacíos cuando se encuentren operculados en sus 2/3 partes (en el caso de climas mediterráneos) o casi totalmente operculados (en el caso de regiones húmedas como las de Galicia).

Para retirar las abejas de los panales se pueden utilizar varios métodos, desde cepillos hasta máquinas de aire o humo.

Por último, también es importante calcular cuidadosamente la provisión de miel que se deja a la colmena. Ésta debe ser suficiente para permitir a las abejas superar sin daños la carencia más o menos prolongada de cosecha, pero no debe ser excesiva para que las obreras no transporten la cría al alza, contaminando y estropeando la miel de la floración inmediata.

1.1.4.2 Desoperculación

Para extraer la miel es necesario desopercular el panal previamente. El desoperculado consiste en la eliminación de los opérculos con los que las abejas han cerrado las celdas del panal cuando la miel está madura.

Esta operación se lleva a cabo con diversos utensilios que van desde un cuchillo hasta máquinas que pasan los panales por un dispositivo desoperculador.

Antes de proceder a la desoperculación es bueno controlar el grado de humedad de la miel. Para ello, se toman diferentes muestras de las celdas del panal en posición central y periférica, efectuándose una medida en el refractómetro y calculando la media de los valores obtenidos. Si ésta es inferior al 18%, se puede proceder al desoperculado; en caso contrario, es necesario deshumidificar mediante una corriente de aire seco.

1.1.4.3 Extracción

La extracción de la miel se puede llevar a cabo mediante diferentes mecanismos:

a) **Centrifugación**

La mayor parte de la miel comercializada actualmente se extrae de los panales mediante un mecanismo de centrifugación. Este sistema posee la ventaja de que es rápido y los panales no sufren ningún daño. Existen dos tipos de centrífugas según la posición de los cuadros: *radiales* y *tangenciales*. Para las mieles fluidas se deben utilizar centrífugas radiales y para las más densas centrífugas tangenciales, comenzando a velocidad moderada y aumentándola progresivamente.

b) **Escurrido**

Consiste en colocar los panales o sus trozos en una rendija dejando escurrir la miel por gravedad sobre unos recipientes. Es un método de extracción poco utilizado porque presenta varios inconvenientes entre los que se encuentra que es un sistema que requiere más tiempo, lo que aumenta los intercambios higrométricos con el ambiente.

c) **Prensado**

Este sistema de extracción está desapareciendo debido a que las mieles así obtenidas presentan un acentuado sabor a polen y a cera, sobre todo si proceden de panales viejos. También presentan impurezas que, debido a su naturaleza y cantidad, las hacen inviables para la comercialización y consumo. Además, presenta un último inconveniente, que destruye el panal.

1.1.4.4 Filtración

Sirve para eliminar las impurezas de la miel como, por ejemplo, fragmentos de panal, de abejas, de polen, de cera que se mezclan con la miel en el proceso de centrifugación. Los filtros o tamices se colocan, a continuación del extractor, ordenados de mayor a menor tamaño de malla, siendo el último tamiz de 0,5 mm de luz.

1.1.4.5 Decantación

Se utiliza para eliminar las burbujas de aire y algunas impurezas que hayan atravesado los filtros anteriores. El tiempo de decantación oscila desde pocos días hasta un mes, dependiendo del tipo de miel y de la temperatura.

1.1.4.6 Envasado

Es la última operación a la que se somete la miel antes de ser presentada al consumidor. Los criterios a los que debe responder un “buen envase” son, entre otros: conservación del producto, cierre hermético, vaciado fácil y completo, higiene, resistencia a la rotura, aspecto atractivo, peso reducido y coste adecuado.

El envase que presenta mayor número de requisitos exigidos es el vidrio. El envase de plástico resulta adecuado para pequeñas partidas con tiempos de venta no superiores a seis meses.

1.1.5 Utilización

El aprovechamiento de la miel se remonta a tiempos prehistóricos. En la antigüedad desempeñó, junto con la cera, un importante papel en todas las civilizaciones como producto de la abeja. La miel se colocaba en la tumba para ser utilizada por el difunto como alimento de su alma. El antiguo testamento describe la tierra prometida como aquella “en la que manan leche y miel”. También en la edad media se consumía la miel como destacado alimento estimulante. Hasta la industrialización del azúcar de caña, fue el único edulcorante de alimentos en el mundo antiguo (*Belitz y Grosch, 1997*).

La importancia de la miel como alimento obedece ante todo a su elevado contenido en carbohidratos fácilmente absorbibles y en sustancias aromáticas (*Belitz y Grosch, 1997*).

Además de consumirse directamente como un alimento más, se utiliza en pastelería, en la elaboración de bebidas alcohólicas o en la fabricación de vino de miel con especias (hidromiel). También se utiliza, asociada a la leche y a productos de cereales, en la alimentación infantil. El tabaco se aromatiza con frecuencia incorporándole miel (*Belitz y Grosch, 1997*).

En la esfera médica, la miel se prescribe en forma pura o bien en preparados (leche con miel o miel de hinojo) así como en pomadas para heridas. En la industria cosmética se preparan productos de gelatina-miel-glicerina y cremas cutáneas que contienen miel (*Belitz y Grosch, 1997*).

1.1.6 Estado actual de la apicultura

La producción mundial de miel es del orden de un millón de toneladas. El principal continente productor es América, seguido por Asia y en tercer lugar, Europa con una producción ligeramente superior a la de África. La Tabla 1.1 aporta datos sobre la producción de miel en el mundo en el año 2007. Los datos proceden de la FAO y se clasifican en grupos geográficos según criterio de la organización (FAO, 2009).

Tabla 1.1 Producción mundial de miel en 2007
(Fuente: FAO).

Grupo geográfico	Toneladas (miles)
África	161,2
América Central y el Caribe	72,8
América del Sur	143,0
América del Norte	98,3
Asia	248,3
Europa	163,4
Oceanía	28,3

La Unión Europea tiene unos 13,6 millones de colmenas, la mayor parte de ellas movilizadas gestionadas por unos 593.000 apicultores de los que únicamente unos 18.000 son profesionales. Los 2,3 millones de colmenas de España producen 29 mil toneladas de miel y hacen que éste sea el primer productor de miel de la Unión Europea. Tras España, destacan Alemania con 24 mil toneladas, Hungría con 22, Francia y Grecia con 14, Polonia con 12 e Italia con 10 mil toneladas. A pesar de esta producción, la Unión Europea importa más de 150 mil toneladas de miel al año, procedente de terceros países (principalmente Argentina y de China). Esta miel importada es por lo general de menor calidad (Mercasa, 2008).

En España existen unos 23.265 apicultores, de los cuales el 25% son profesionales. El resto son apicultores aficionados, que explotan un reducido número de colmenas para satisfacer sus necesidades de miel, vendiendo eventualmente parte de su producción.

La producción española de miel resulta bastante variable al igual que la de otros países ya que disminuye durante los años de sequía y mejora cuando la floración es muy intensa y persistente. Asimismo, la varroasis (enfermedad que sufren las abejas, producida por el ácaro varroa) merma la actividad de las abejas ya que las debilita hasta el extremo de provocar su muerte. La varroasis, que da origen a una miel de peor calidad, es una plaga que azota nuestra producción apícola y la de otros países comunitarios. Pero la varroasis no es el mayor problema de la apicultura actualmente sino el síndrome de desaparición (SDC) cuya causa aún no ha sido demostrada y que las asociaciones de apicultura atribuyen a los pesticidas neurotóxicos de última generación.

La mayor parte de las colmenas españolas son movilizadas y se trasladan de un sitio a otro buscando un mejor aprovechamiento de las distintas floraciones. Queda todavía un 6% de colmenas estáticas. La producción de una colmena movilizadora es del orden de 15-16 kilogramos anuales, dependiendo de las lluvias, del calor y de la fenología de la zona. Asimismo depende de la buena o mala programación de los asentamientos. La producción de una colmena fijista viene a ser la mitad de una movilizadora, pues depende sobremanera de la floración de la zona donde se haya establecido (*Mercasa, 2008*).

Normalmente se produce miel en todas las regiones españolas. La existencia de plantaciones regulares de frutales y las plantas aromáticas resultan fundamentales para la producción mielera. Asimismo influye la tradición apícola y la fama adquirida por determinadas regiones productoras. Destacan por su número total de colmenas: Andalucía, Comunidad Valenciana, Castilla y León y Extremadura. En la Figura 1.8 se muestran los porcentajes de producción en las diferentes comunidades autónomas. En el año 2007, el valor de la producción de miel española puede estimarse en unos 115 millones de euros.

En Galicia, unos 4.700 apicultores tienen 92.696 colmenas que han producido 1.227.367 Kg de miel durante el año 2007 (*MARM, 2007*).

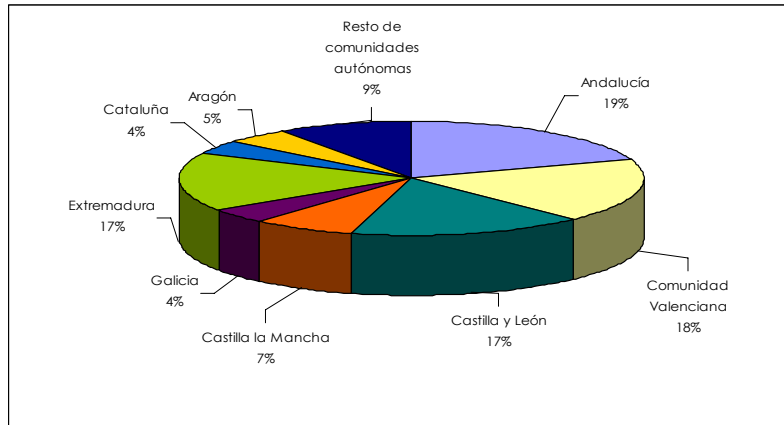


Figura 1.8 Proporción de la producción de miel en España en el 2007 (MARM, 2007).

La importancia y el interés del mercado gallego en el sector apícola quedan reflejados con la aparición de diferentes reglamentaciones con el fin de mejorar la calidad del producto para permitir una mejor comercialización del mismo. Así, actualmente la miel de Galicia posee una denominación de origen llamada “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” y cuyo logotipo se muestra en la Figura 1.9 (DOG, 2009).



Figura 1.9 Logotipo de la “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia”.

La Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia cuenta con unas 30.952 colmenas inscritas pertenecientes a 410 apicultores y 37 plantas envasadoras, en las que se certificaron 304.000 kilos de miel durante el año 2007 (MARM, 2007; Mercasa, 2008).

1.1.7 Composición química

La miel es un producto biológico muy complejo por lo que su composición exacta no se conoce totalmente. Lo que sí se sabe es que varía en función de dos factores: la composición del néctar o mielato del que procede y factores externos, como las condiciones climáticas, la zona geográfica, la maduración o las prácticas de los apicultores en la extracción de la misma.

Los componentes principales de la miel son los azúcares representando los monosacáridos glucosa y fructosa el 85% de los sólidos totales. También existen disacáridos como la maltosa, isomaltosa y sacarosa; trisacáridos como la melecitosa, erlosa o rafinosa y azúcares superiores como las dextrinas. Además de los azúcares, la miel contiene agua, cuyo contenido oscila entre el 12,20 y 22,90% (Tabla 1.2). Este parámetro influye decisivamente en la estabilidad de la miel frente a la fermentación y la granulación y también en propiedades tales como la viscosidad, la densidad y las características organolépticas (White, 1979a).

Tabla 1.2 Composición promedio y rango de algunos componentes de las mieles florales y de mielada (*Basado en 490 muestras florales y 14 de mielada*) (White, 1978; White, 1979a).

Característica o componente	Miel floral		Miel de mielada	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Componentes mayoritarios ($\approx 99\%$)				
Humedad (%)	17,20	13,40 – 22,90	16,30	12,20 – 18,20
Fructosa (%)	38,19	27,25 – 44,26	31,80	23,91 – 38,12
Glucosa (%)	31,28	22,03 – 40,75	26,08	19,23 – 31,86
Maltosa (%)	7,31	2,74 – 15,98	8,80	5,11 – 12,48
Sacarosa (%)	1,31	0,25 – 7,57	0,80	0,44 – 1,14
Azúcares superiores (%)	1,50	0,13 – 8,49	4,70	1,28 – 11,50
Componentes minoritarios ($\approx 1\%$)				
Acidez total (meq/kg)	29,12	8,68 – 59,49	54,88	34,62 – 76,49
Cenizas (%)	0,169	0,020 – 1,028	0,736	0,212 – 1,185
N ₂ (aminoácidos y proteínas) (%)	0,041	0,000 – 0,133	0,100	0,047 – 0,223
Índice de diastasas (escala de Gothe)	20,8	2,10 – 61,20	31,9	6,70 – 48,40

Por último, cabe destacar la presencia de otros compuestos que, aunque se encuentran en la miel en pequeña proporción (aproximadamente el 1%) son muy importantes porque van a determinar parte de las características de la misma tales como el color, el aroma y el sabor. Entre estos componentes se encuentran los **minerales**, ácidos orgánicos, aminoácidos, proteínas, enzimas, vitaminas, sustancias volátiles aromáticas y un sinfín de residuos sólidos insolubles en agua como el polen o los indicadores de mielada (esporas, hongos e hifas, algas verdes, etc).

1.1.8 Factores esenciales de composición y calidad

Cuando la miel se comercializa como tal o se utiliza en cualquier producto destinado al consumo humano, no deberá tener sabor, aroma o color desagradable, que proceda de la absorción de materias extrañas durante la elaboración, envasado y/o almacenamiento. No habrá comenzado a fermentar ni presentará efervescencia. Tampoco se puede modificar artificialmente la acidez de la misma ni se podrá calentar hasta aquel grado en el que se inactiven, total o en gran parte, los enzimas naturales que contiene. Está prohibida la adición de cualquier ingrediente o aditivo alimentario, así como de sustancias destinadas al aumento de peso. Asimismo, la miel deberá estar exenta de sustancias inorgánicas y organismos extraños a su composición, tales como mohos, insectos o restos de los mismos, larvas o granos de arena. Por último, no deberá contener sustancias tóxicas que deriven de microorganismos o plantas en cantidades que puedan constituir un peligro para la salud (FAO, 1990; DOCE, 2002; BOE, 2003).

A partir del 1 de agosto de 2003, los criterios de calidad que deben reunir las mieles comercializadas en España son los establecidos por la Directiva 2001/110/CE del Consejo de 20 de diciembre de 2001, relativa a la miel (DOCE, 2002). Esta directiva está recogida en nuestra legislación en el Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel (BOE, 2003). Esta nueva reglamentación supone modificaciones en los límites de algunos parámetros y la inclusión de dos nuevas características de composición: la conductividad eléctrica y el contenido en glucosa + fructosa que sustituyen al contenido en cenizas y al contenido en azúcares reductores, respectivamente.

Si una miel se encuentra, además, bajo una Denominación de Origen o Indicación Geográfica Protegida determinada, como es el caso de la miel “Indicación Geográfica Protegida Mel de Galicia” (DOG, 2009), cumplirán unos requisitos propios, que generalmente son más restrictivos y están adaptados a su zona de influencia. En la Tabla 1.3 se muestran las características de estas reglamentaciones.

Tabla 1.3 Criterios de calidad de la miel en la reglamentación actual y en la "Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia".

CRITERIOS DE CALIDAD	DOCE (2002)	DOG (2009)
	BOE (2003)	"Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia"
SACAROSA APARENTE		
Miel de flores en general	≤ 5	≤ 5
Miel de acacia (<i>Robinia</i> sp.), miel de mielada y sus mezclas	≤ 10	≤ 10
Miel de espliego (<i>Lavandula</i> sp.) y de borraja (<i>Borago officinalis</i>)	≤ 15	≤ 15
Miel de alfalfa (<i>Medicago</i> sp.), azahar (<i>Citrus</i> sp.), <i>Hedysarum</i> sp.; <i>Banksia menziesii</i> ; <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ; <i>Eucryphia lucida</i> ; <i>Eucryphia milliganii</i>	≤ 10	≤ 10
FRUCTOSA + GLUCOSA		
Miel de flores en general	≥ 60	≥ 60
Miel de mielada y su mezcla con miel de flores	≥ 45	≥ 45
HUMEDAD O CONTENIDO EN AGUA		
Miel en general	≤ 20	≤ 18.5
Miel de brezo (<i>Calluna</i> sp.)	≤ 23	
SÓLIDOS INSOLUBLES EN AGUA		
Miel en general	≤ 0.1	≤ 0.1
Miel prensada	≤ 0.5	≤ 0.5
CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA		
Miel de flores en general	≤ 0.8 mS/cm	≤ 0.8 mS/cm
Miel de mielada, miel de castaño (<i>Castanea sativa</i> Miller) y/o sus mezclas	≥ 0.8 mS/cm	≥ 0.8 mS/cm
Excepciones: <i>Arbustus</i> sp.; <i>Erica</i> sp.; <i>Eucalyptus</i> sp.; <i>Tilia</i> sp.; <i>Calluna</i> sp.; <i>Leptospermum</i> sp.; <i>Melaleuca</i> sp	variable	variable
ACIDEZ LIBRE		
Miel en general	≤ 50 meq/kg	≤ 50 meq/kg
ACTIVIDAD DIASTÁSICA		
	(Escala de Shade)	(Escala de Gothe)
Miel en general	≥ 8	≥ 9
Miel con bajo contenido en enzimas naturales	≥ 3	≥ 4
	(si HMF ≤ 10 mg/kg)	(si HMF ≤ 10 mg/kg)
HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)		
Miel en general	≤ 40 mg/kg	≤ 28 mg/kg

1.2 MINERALES

Los elementos minerales que contiene una miel proceden fundamentalmente del suelo donde ha crecido la planta de la que proviene. Se presentan generalmente en forma de carbonatos, fosfatos, silicatos o sulfatos de iones metálicos. Estos minerales son absorbidos en forma de sus sales disueltas en agua, que pasan de las raíces a la savia de las plantas y de ahí son bombeados a los nectarios, donde se incorporan al néctar (*Crane, 1990; Gómez, 2004*).

El contenido mineral de una miel varía en función de las condiciones edáficas y climáticas, del origen botánico y de la técnica de extracción utilizada. De manera global, se expresa como porcentaje en cenizas siendo éste del 0,169% como valor promedio para mieles florales con un rango entre 0,020 y 1,028% y del 0,736% como promedio con un rango entre 0,212 y 1,185% en las mieles de mielada (*White, 1978; McGregor, 1979; Gonnet, 1982*).

El elemento mineral predominante en la miel es el potasio con contenidos medios de aproximadamente una tercera parte de su contenido total. Además del potasio, los minerales más frecuentemente encontrados en la miel son el sodio, calcio, magnesio, hierro, cobre, manganeso, cloro, fósforo, azufre y sílice (*White, 1978*).

Además de estos minerales, en la miel se han encontrado cantidades traza de unos 41 elementos en muestras recolectadas por las abejas en las proximidades de una autopista que se sabe son emitidos por motores de combustión, quedando así demostrada la capacidad de este alimento como indicador de polución (*Tong et al., 1975*).

La importancia de los minerales en la miel radica en que pueden ser indicadores del origen geográfico de la misma y de la contaminación de la zona (*Anklam, 1998; González-Paramás et al., 2000; Przybyłowski y Wilczynska, 2001*). También existen estudios que indican que se podría determinar el espectro polínico o el origen botánico de las mieles con un análisis estadístico o quimiométrico de su contenido mineral (*Radovic et al., 2001*).

1.3 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS RELACIONADOS CON LOS MINERALES

Las sales minerales influyen en propiedades tales como el color, la conductividad eléctrica y el pH de la miel, como ya se ha comentado anteriormente.

El **color** es una propiedad óptica resultado de los distintos grados de absorción de luz a diferentes longitudes de onda por parte de los componentes de este alimento (FAO, 1990). El color de la miel varía enormemente desde prácticamente incoloro hasta casi negro dependiendo principalmente de su origen y de su composición (White, 1979b; Crane, 1990).

La **conductividad eléctrica** es una propiedad física de la miel relacionada fundamentalmente con el contenido en sales minerales. Se ha comprobado que la conductividad eléctrica es directamente proporcional al contenido en cenizas y la acidez de la miel, siendo tanto mayor cuanto más elevados son estos valores (Vorwohl, 1964).

El **pH** indica la acidez de la miel y depende principalmente de la cantidad de ácidos ionizados que presenta, aunque su valor se va a ver afectado también por el contenido en sales minerales, especialmente potasio, sodio y calcio (White, 1979b).

1.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 📖 AGA (ASOCIACIÓN GALEGA DE APICULTORES). Mel de calidade. *Abelleira*. **1998**. Nº especial de invierno. pp 60.
- 📖 Anklam, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*. **1998**, 63(4), 549-562.
- 💻 Azcoytia, C. Historia de la miel hace 2000 años. <<http://www.historiacocina.com/historia/articulos/miel.htm>> [consulta: 20 noviembre 2008].
- 📖 Belitz, H. D.; Grosch, W. *Química de los alimentos*. 2ª ed.; Zaragoza, España, **1997**, pp 946-955.
- 📖 BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. Madrid. España. **2003**.
- 📖 Codex Alimentarius. (FAO/WHO). *Norma del Codex para la Miel*. CODEX STAN 12-1981, Rev. 2. **2001**.
- 📖 Crane, E. The traditional hive products: honey and beeswax. En *Bees and Beekeeping. Science, practice and world resources*, Heinemann Newnes: Oxford, U.K., **1990**, pp 388-451.
- 📖 DOCE (DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS). Directiva 2001/110/CE del Consejo de 20 de diciembre de 2001, relativa a la miel. Bruselas. Bélgica. **2002**.
- 📖 DOG (DIARIO OFICIAL DE GALICIA). Orden del 14 de agosto de 2009, por la que se aprueba el Reglamento de la "Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia" y de su Consejo Regulador. Santiago de Compostela (A Coruña). España. **2009**.

- FAO. *Control de calidad de la miel y la cera. Boletín de Servicios Agrarios 68/3*. Roma. Italia, **1990**.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <<http://faostat.fao.org>> [consulta: 5 mayo 2009].
- Gómez, A. *Mieles de España y Portugal. Conocimiento y cata*. Barcelona. España, **2004**, Vol. 3, pp 44-56.
- Gonnet, M. *Le miel. Composition, propriétés e conservation*. 2ª ed.; Montfavet. Francia, **1982**, pp 1-32.
- González-Paramás, A. M.; Báñez, J. A. G.; García-Villanova, R. J.; Pala, T. R.; Albajar, R. A.; Sánchez, J. S. Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, 80(1), 157-165.
- Louveaux, J. Le miel. *Cah. Nutr. Diet.* **1985**, 20(1), 57-70.
- MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <<http://www.mapa.es/es/alimentacion/pags/Denominacion/htm/MielGalicia.htm>> [consulta: 2 abril 2006].
- MARM (MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO). Anuario de Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Madrid. España. **2007**.
- Maurizio, A. *How bees make honey. En: Honey: A comprehensive Survey*. London. UK, **1979**.
- McGregor, S. E. *La Apicultura en los Estados Unidos*. México, **1979**.
- Mercasa. Informe sobre producción, industria, distribución y consumo de alimentación en España. **2008**, pp 323-330.
- Piana, G.; Ricciardelli D'Albore, G.; Isola, A. *La miel*. Madrid. España, **1989**, pp 14-67.

- Przybylowski, P.; Wilczynska, A. Honey as an environmental marker. *Food Chemistry*. **2001**, 74(3), 289-291.
- Radovic, B. S.; White, R.; Parker, I.; Dennis, M. J.; Sharman, M.; Geiss, H.; Anklam, E. Contribution of high temperature gas chromatographic analysis of oligosaccharides and ion chromatographic analysis of various cations and anions to authenticity testing of honey. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. **2001**, 97(10), 380-384.
- Robles, E. M.; Salvachúa, J. C. *Los alimentos en las abejas*. En: *Alimentación de las abejas. Aplicación práctica de los fundamentos fisiológicos de la nutrición*. Egido - Almazán. ed.; España, **1999**, pp 61.
- Root, A. I. *ABC y XYZ de la apicultura*. 10 ed.; Buenos Aires. Argentina, **1976**, pp 129, 368-374.
- Schmidt, J. O.; Buchmann, S. L. *Other products of the hive*. En: *The hive and the honey bee*. Hamilton, Illinois, USA., **1992**, Vol. 22, pp 927-988.
- Tong, S. S. C.; Morse, R. A.; Bache, C. A.; Lisk, D. J. Elemental analysis of honey as an indicator of pollution. *Archives of Environmental Health*. **1975**, 30, 329-332.
- USDA. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. <www.ars.usda.gov/is/espanol/pr/2007/070906.es.htm> [consulta: 2 julio 2009].
- Vorwohl, G. Die Beziehungen zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtmässigen Herkunft. *Annls Abeille*. **1964**, 7(4), 301-309.
- White, J. W., Jr. *Honey (Advances in Food Research)*. New York, **1978**, Vol. 24, pp 287-374.
- White, J. W., Jr. *Composición y propiedades de la miel*. Limusa: México D. F., **1979a**, pp 57-66.

- 📖 White, J. W., Jr. *Honey: A Comprehensive Survey*. Heinemann: London. UK, **1979b**, pp 157-206.



[illegible]

CAPÍTULO 2

Objeto del trabajo



Los objetivos que se han fijado en la realización de este trabajo son los siguientes:

- ✎ Realizar una revisión bibliográfica sistemática de la literatura científica relacionada con los temas a estudio en este trabajo.
- ✎ Determinar los parámetros físico químicos relacionados con los minerales, como son el color, la conductividad eléctrica y el pH en mieles procedentes de diferentes orígenes botánicos y geográficos.
- ✎ Poner a punto métodos analíticos para la determinación de los aniones y cationes mediante electroforesis capilar y aplicarlos a la determinación de muestras de miel y otros alimentos.
- ✎ Determinar el contenido de los minerales en muestras de miel procedentes de diferentes orígenes botánicos y geográficos con los métodos propuestos.
- ✎ Comparar los diferentes parámetros analizados para encontrar relaciones entre los mismos.
- ✎ Llevar a cabo un análisis estadístico multivariante con el fin de:
 - Clasificar las mieles en función de su origen botánico.
 - Clasificar las mieles en función de la comunidad autónoma de procedencia del envasador.
 - Diferenciar entre las mieles de Galicia con “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” de las procedentes de otras zonas de España.
 - Clasificar las mieles de Galicia con “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” en función de la provincia de procedencia.





CAPÍTULO 3
Muestras



Para la realización de este trabajo se han analizado un total de 125 muestras de miel procedentes de diferentes regiones de España.

El origen botánico de las mismas se ha determinado de acuerdo con el procedimiento descrito por *Louveaux et al. (1978)*, después de tratar el sedimento de las mieles mediante el método de *Terradillos et al. (1994)*.

Según *Von der Ohe et al. (2004)*, una miel se considera multifloral cuando no existe ningún polen predominante y monofloral cuando tiene más de un 45% de pólenes de una misma planta. En algunos casos, es necesario corregir este porcentaje debido a la relación entre el polen y el néctar aportados. Por ejemplo, para clasificar a una miel como monofloral de *Castanea sativa* Miller, debe presentar un porcentaje de pólenes de esta especie mayor del 86%. Sin embargo, se considerarán mieles monoflorales de *Citrus* sp., si presentan un porcentaje de pólenes entre 2 y 42% o mieles monoflorales de *Rosmarinus* sp., si presentan un porcentaje de pólenes entre 10 y 57%.

Se considera que una miel es mielada cuando el número de elementos de mielada (HDE) es tres veces superior al número de granos de polen (PG) y se considera que una miel es mezcla de floral y mielada cuando el número de elementos de mielada es dos veces superior al número de granos de polen (*Von der Ohe et al., 2004*).

Las muestras de miel analizadas se han clasificado según su origen botánico y según el origen geográfico de procedencia del envasador. Además, las mieles de Galicia han sido agrupadas según la provincia de origen del envasador para facilitar la discusión de los resultados obtenidos.

3.1 ORIGEN BOTÁNICO Y GEOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS DE MIEL

Las características de las muestras de miel objeto de este trabajo se resumen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 (continúa) | Muestras de miel analizadas en este trabajo.

Nº muestra	Procedencia del envasador		Origen botánico
	Comunidad Autónoma	Provincia	
1	Castilla La Mancha	Cuenca	<i>Lavandula</i> sp.
2	Castilla La Mancha	Cuenca	<i>Rosmarinus</i> sp.
3	Castilla La Mancha	Guadalajara	<i>Rosmarinus</i> sp. y <i>Trifolium</i> L. sp.
4	Castilla La Mancha	Guadalajara	<i>Echium</i> sp.
5	Castilla La Mancha	Guadalajara	<i>Lavandula</i> sp.
6	Castilla La Mancha	Guadalajara	<i>Rosmarinus</i> sp.
7	Castilla La Mancha	Guadalajara	<i>Rosmarinus</i> sp.
8	Castilla y León	Ávila	<i>Citrus</i> sp.
9	Castilla y León	Ávila	<i>Erica</i> sp.
10	Castilla y León	Ávila	<i>Lavandula</i> sp.
11	Castilla y León	Ávila	Multifloral
12	Castilla y León	Ávila	Multifloral y de mielada
13	Castilla y León	Ávila	<i>Rosmarinus</i> sp.
14	Castilla y León	Burgos	Multifloral
15	Castilla y León	Burgos	Multifloral
16	Castilla y León	Burgos	<i>Lavandula</i> sp.
17	Castilla y León	Burgos	Multifloral
18	Castilla y León	Burgos	Multifloral
19	Castilla y León	Burgos	Multifloral
20	Castilla y León	Burgos	Multifloral
21	Castilla y León	Burgos	Multifloral
22	Castilla y León	Burgos	Multifloral
23	Castilla y León	Burgos	Multifloral
24	Castilla y León	Burgos	Multifloral
25	Castilla y León	Burgos	Multifloral
26	Castilla y León	Burgos	Multifloral
27	Castilla y León	Burgos	<i>Erica</i> sp.
28	Castilla y León	Burgos	Multifloral
29	Castilla y León	Burgos	Multifloral
30	Castilla y León	Burgos	<i>Trifolium</i> L. sp.
31	Castilla y León	Burgos	Multifloral
32	Castilla y León	Burgos	Multifloral
33	Castilla y León	Burgos	Multifloral
34	Castilla y León	Burgos	Multifloral
35	Castilla y León	Burgos	Multifloral
36	Castilla y León	Burgos	Multifloral
37	Castilla y León	Burgos	Multifloral
38	Castilla y León	Burgos	Multifloral
39	Castilla y León	León	Multifloral
40	Castilla y León	Zamora	<i>Diplotaxis</i> sp.
41	Comunidad Valenciana	Castellón	<i>Citrus</i> sp.
42	Comunidad Valenciana	Castellón	<i>Eucalyptus</i> sp.
43	Comunidad Valenciana	Castellón	<i>Eucalyptus</i> sp.
44	Comunidad Valenciana	Castellón	Multifloral
45	Comunidad Valenciana	Castellón	Multifloral
46	Comunidad Valenciana	Castellón	Multifloral y de mielada
47	Comunidad Valenciana	Castellón	<i>Rosmarinus</i> sp.
48	Comunidad Valenciana	Castellón	<i>Rosmarinus</i> sp.
49	Extremadura	Cáceres	Multifloral
50	Extremadura	Cáceres	Multifloral
51	Galicia	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
52	Galicia	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
53	Galicia	A Coruña	Multifloral
54	Galicia	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
55	Galicia	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
56	Galicia	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
57	Galicia	A Coruña	Multifloral
58	Galicia	A Coruña	<i>Castanea sativa</i> Miller
59	Galicia	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
60	Galicia	A Coruña	Multifloral
61	Galicia	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
62	Galicia	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
63	Galicia	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.

Tabla 3.1 (continuación) | Muestras de miel analizadas en este trabajo.

Nº muestra	Procedencia del envasador		Origen botánico
	Comunidad Autónoma	Provincia	
64	Galicia	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
65	Galicia	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
66	Galicia	A Coruña	Multifloral
67	Galicia	A Coruña	Multifloral
68	Galicia	A Coruña	Multifloral
69	Galicia	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
70	Galicia	A Coruña	Multifloral
71	Galicia	A Coruña	Multifloral
72	Galicia	A Coruña	Multifloral
73	Galicia	Lugo	<i>Trifolium</i> L. sp.
74	Galicia	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.
75	Galicia	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.
76	Galicia	Lugo	Multifloral
77	Galicia	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.
78	Galicia	Lugo	Multifloral
79	Galicia	Lugo	Multifloral
80	Galicia	Lugo	Multifloral
81	Galicia	Lugo	Multifloral
82	Galicia	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.
83	Galicia	Lugo	Multifloral
84	Galicia	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.
85	Galicia	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.
86	Galicia	Lugo	Multifloral
87	Galicia	Lugo	Multifloral
88	Galicia	Lugo	Multifloral
89	Galicia	Lugo	Multifloral
90	Galicia	Lugo	Multifloral
91	Galicia	Lugo	Multifloral
92	Galicia	Lugo	Multifloral
93	Galicia	Lugo	Multifloral
94	Galicia	Lugo	Multifloral
95	Galicia	Lugo	Multifloral
96	Galicia	Lugo	Multifloral
97	Galicia	Ourense	Multifloral
98	Galicia	Ourense	Multifloral
99	Galicia	Ourense	Multifloral
100	Galicia	Ourense	Multifloral
101	Galicia	Ourense	Multifloral
102	Galicia	Ourense	Multifloral
103	Galicia	Ourense	Multifloral
104	Galicia	Ourense	Multifloral
105	Galicia	Ourense	Multifloral
106	Galicia	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller
107	Galicia	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller
108	Galicia	Ourense	Multifloral
109	Galicia	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller
110	Galicia	Ourense	Multifloral
111	Galicia	Ourense	<i>Rubus</i> sp
112	Galicia	Pontevedra	Multifloral
113	Galicia	Pontevedra	Multifloral
114	Galicia	Pontevedra	Multifloral
115	Galicia	Pontevedra	Multifloral
116	Galicia	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.
117	Galicia	Pontevedra	Multifloral
118	Galicia	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.
119	Galicia	Pontevedra	Multifloral
120	Galicia	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.
121	Galicia	Pontevedra	Multifloral
122	Galicia	Pontevedra	Multifloral
123	Galicia	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.
124	Galicia	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.
125	Galicia	Pontevedra	Multifloral

3.1.1 Origen botánico de las muestras

Todas las muestras analizadas son florales excepto dos que son mezcla florales y de mielada. No se ha encontrado ninguna miel únicamente de mielada.

Como se observa en la Tabla 3.1, la mayoría de las muestras son multiflorales y existe un número elevado de muestras monoflorales de *Eucalyptus* sp. Solamente se encontró una muestra monofloral de *Diplotaxis*, sp., una monofloral de *Echium*, sp., una miel mezcla de *Rosmarinus* y *Trifolium*, sp. y una muestra monofloral de *Rubus*, sp.

3.1.2 Origen geográfico de las mieles

3.1.2.1 Comunidad autónoma de procedencia del envasador

Se han seleccionado regiones con una importante producción de miel teniendo 75 mieles de Galicia, 33 muestras procedentes de Castilla y León, 8 de la Comunidad Valenciana, 7 muestras de Castilla La Mancha y 2 de Extremadura. Tanto las mieles procedentes de Castilla La Mancha como las de Extremadura pertenecen a las Denominaciones de Origen “Miel de la Alcarria” (DOCM, 1992; BOE, 1993) y “Villuercas-Ibores” (DOE, 1987 y 1999), respectivamente.

3.1.2.2 Mieles gallegas clasificadas según la provincia de procedencia del envasador

Se han analizado 75 muestras de miel, todas ellas amparadas por la “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” (DOG, 2009).

Teniendo en cuenta el origen geográfico de los envasadores de las mieles gallegas analizadas, se observa que 22 muestras proceden de la provincia de A Coruña, 24 de la provincia de Lugo, 15 de la provincia de Ourense y 14 de la provincia de Pontevedra.

En relación con el origen botánico de estas muestras, cabe destacar que 3 de las 4 muestras de *Castanea sativa* Miller proceden de Ourense, la mayoría de las 23 muestras de *Eucalyptus* sp. proceden de la provincia de A Coruña (n=12) y la única miel de *Trifolium*, sp. procede de Lugo.

3.2 CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron suministradas en frascos de vidrio de 500 g o 1000 g con cierre hermético.

Con el fin de facilitar la toma de muestra para los diferentes análisis, las muestras se han trasvasado en porciones de aproximadamente 200 g a frascos de vidrio de 250 g de capacidad con tapón de plástico, perfectamente etiquetados, limpios y secos. El trasvase de la muestra se ha realizado tras una homogeneización mecánica de la miel sin calentamiento de las mismas.

Las muestras se han almacenado en el laboratorio a una temperatura media de 20°C (15-25°C), en un ambiente libre de olores y en la oscuridad.

3.3 TOMA DE MUESTRA

3.3.1 Homogeneización

Se trata de un proceso muy importante para realizar tomas de muestras representativas.

Es conveniente agitar la miel con una espátula adecuada al tamaño de la muestra durante un tiempo suficiente.

En el caso de que la miel se encuentre cristalizada o excesivamente consistente, es necesario reblandecerla en recipiente cerrado a una temperatura comprendida entre 25 y 30°C (BOE, 1986).

3.3.2. Licuación

Este proceso debe realizarse cuando se analice la humedad, el color o la composición en azúcares de las muestras de miel y no deberá realizarse bajo ningún concepto para la determinación de la actividad enzimática o el contenido en hidroximetilfurfural de la miel.

Se toma una fracción homogeneizada de la muestra del laboratorio de tamaño adecuado y se introduce en un recipiente de vidrio pequeño, provisto de cierre hermético. Se calienta al baño María hasta la fusión a una temperatura de 50°C durante el mínimo tiempo necesario. Se agita de vez en cuando para favorecer el proceso y cuando la fusión tenga lugar, se saca la muestra del baño y se enfría rápidamente (BOE, 1986).

3.3.3 Limpieza

La limpieza de la miel debe realizarse cuando ésta contenga trozos de cera, tierra, piedrecillas, restos de insectos, etc.

Para ello, la muestra se calienta en un baño María a unos 40°C en un recipiente de vidrio herméticamente cerrado. Posteriormente, se filtra a través de una malla de luz de 200-250 mm, enfriando rápidamente el filtrado recogido.

Si se ha practicado la licuación anteriormente, puede aprovecharse este proceso para filtrar la muestra cuando la misma se encuentre caliente. Si la miel se encuentra parcial o totalmente solidificada, es necesario realizar la licuación previa a la filtración (BOE, 1986).

Cabe resaltar que no fue necesario realizar ninguna limpieza en las muestras de miel analizadas para la realización de este trabajo.



3.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 📖 BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Orden del 12 de junio, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel. Madrid. España. **1986**.
- 📖 BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Orden del 3 de noviembre, por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de origen "Miel de la Alcarria" y de su Consejo Regulador. Madrid. España. **1993**.
- 📖 DOCM (DIARIO OFICIAL DE CASTILLA LA MANCHA). Orden del 11 de noviembre de 1992, por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación de Origen "Miel de la Alcarria" y de su Consejo Regulador. Toledo. España. **1992**.
- 📖 DOE (DIARIO OFICIAL DE EXTREMADURA). Orden del 16 de diciembre de 1987, por la que se reconoce con carácter provisional la Denominación de calidad de la miel "Villuercas-Ibores". Mérida (Badajoz). España. **1987**.
- 📖 DOE (DIARIO OFICIAL DE EXTREMADURA). Orden del 11 de enero de 1999, por la que se reconoce con carácter provisional la Denominación de calidad de la miel "Villuercas-Ibores". Mérida (Badajoz). España. **1999**.
- 📖 DOG (DIARIO OFICIAL DE GALICIA). Orden del 14 de agosto de 2009, por la que se aprueba el Reglamento de la "Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia" y de su Consejo Regulador. Santiago de Compostela (A Coruña). España. **2009**.
- 📖 Louveaux, J.; Maurizio, A.; Vorwohl, G. Methods of melissopalynology. *Bee World*. **1978**, 59(4), 139-157.
- 📖 Terradillos, L. A.; Muniategui, S.; Sancho, M. T.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J. An alternative method for analysis of honey sediment. *Bee Science*. **1994**, 3(2), 86-93.

- 📖 Von der Ohe, W.; Persano Oddo, L.; Piana, M. L.; Morlot, M.; Martin, P. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*. **2004**, 35, S18-S25.





CAPÍTULO 4

Parámetros físico químicos



4.1 COLOR

El color es definido por la Real Academia Española de Lengua como la sensación producida por los rayos luminosos que impresionan los órganos visuales y que depende de la longitud de onda (RAE, 2008).

El color es el primer atributo valorado por los consumidores siendo conocida su influencia en la aceptación o rechazo de algunas comidas y alimentos (Montes *et al.*, 2004), entre ellos la miel (Negueruela y Pérez-Arquille, 2000).

Las mieles muestran muy diferentes colores, desde el blanco o amarillo claro al rojo oscuro o incluso negro. Los carotenos, xantofilas y flavonoides del néctar floral son los responsables del color de la miel. De la misma forma, el contenido mineral del suelo que pasa al néctar de la planta proporciona color a la miel (Crane, 1990; Negueruela y Pérez-Arquille, 2000).

Varios estudios indican la relación que existe entre el color de las mieles y el origen floral, los procesos industriales, la temperatura y/o el tiempo de almacenamiento (Crane, 1990; González-Miret *et al.*, 2005).

4.1.1 Antecedentes bibliográficos

Los procedimientos para la medición del color se podrían clasificar en subjetivos o sensoriales y objetivos o instrumentales (Negueruela y Pérez-Arquille, 2000; Terrab *et al.*, 2002).

Los métodos **subjetivos** se dividen en dos grandes grupos, los sistemas visuales que comparan la miel con una serie de patrones (Sechrist, 1925; Brice *et al.*, 1956; Barbier y Valin, 1957; Kottász, 1958) y los sensoriales en los que se utiliza un panel de expertos o catadores que realizan una evaluación sensorial (González-Viñas *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2009).

Entre los métodos visuales destaca el graduador de color de Pfund desarrollado por Sechrist (1925) y ampliamente usado para la evaluación del color de la miel. Se trata de un sistema de comparación visual de la muestra con patrones de cristal color ámbar que proporciona medidas continuas en todo el

rango. El índice de Pfund permite la clasificación de las muestras en 7 categorías de color: “water white”, “extra white”, “white”, “extra light amber”, “light amber”, “amber” y “dark amber”. Esta misma clasificación fue utilizada por *Brice et al. (1956)* que desarrollaron un sistema de patrones de cristal de colores permitiendo clasificar las mieles mediante comparación visual. Estos investigadores llevaron a cabo un examen físico completo del color de las mieles de Estados Unidos estableciendo las clases de color de las mismas. Además, obtuvieron datos espectrofotométricos de varias características de la miel en todos los rangos de color calculando los valores colorimétricos de la *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE). Concluyeron que los principales responsables del color de la miel, el maple, las soluciones de caramelo y otros azúcares eran similares.

Entre los métodos **objetivos** para la determinación del color en las muestras de miel destacan las técnicas espectrofotométricas. Estas técnicas se basan en la medida de la absorbancia o de la transmitancia a una o varias longitudes de onda o el escaneo de todo el espectro. Para ello, se utilizan cubetas de 1 cm de espesor y la preparación de la muestra se realiza con la centrifugación (para eliminar burbujas) o la dilución de la miel en agua o en glicerina.

Con el objetivo de que la búsqueda bibliográfica tenga reproducibilidad, se ha realizado una revisión sistemática de la literatura científica cuyas características se resumen en la Tabla 4.1 y cuyo resultado aparece en la Tabla 4.2.

En esta última tabla se indican las técnicas de determinación del color más comunes y los autores que las han desarrollado, observándose que la determinación del color de las muestras de miel se realiza, en muchas ocasiones, con el objeto de caracterizarlas según su origen botánico o geográfico.

Huidobro y Simal (1984a) se basan en un método de determinación del color en vinos (*BOE, 1981*) para desarrollar la determinación espectrofotométrica del color de 115 muestras de miel.

Soria et al. (2004) determinan los parámetros del color mediante dos metodologías: colorimetría y espectrofotometría UV-Vis. Aplican el método espectrofotométrico descrito por *Huidobro y Simal (1984a)*. En relación al método colorimétrico que llevan a cabo, se basa en la obtención de los parámetros del CIELAB (CIE-L*a*b*) y las coordenadas x e y con un colorímetro que utiliza cubetas cilíndricas de cristal óptico.

Tabla 4.1 Características de la revisión sistemática realizada en relación con los métodos de determinación del color en la miel.

Período de búsqueda	Hasta el 2 abril de 2009	
Base de datos	MEDLINE, SCIFINDER SCHOLAR y SCOPUS	
Estrategia de búsqueda	Honey and color (en título, resumen o palabras clave)	
Herramienta de selección de estudios	Lectura del resumen	
CRITERIOS DE SELECCIÓN	Inclusión	Exclusión
1. Tipo de estudio	Métodos de determinación del color	Miel en cosmética (tintes para cabello, champús, cremas, etc.)
	Muestras de miel	Todo lo relacionado con el color miel
	Miel como alimento	Lo no referido a la miel como alimento
2. Idioma	Estudios en español, inglés, francés, italiano y portugués	Estudios en otros idiomas
3. Accesibilidad	Disponibles	No disponibles
RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA		
ARTÍCULOS ENCONTRADOS		276
ARTÍCULOS ELIMINADOS		250
ARTÍCULOS LEÍDOS A TEXTO COMPLETO		26
ARTÍCULOS INCLUIDOS EN LA REVISIÓN		21
Artículos incluidos en la revisión después de la lectura de los anteriores		7
Artículos eliminados después de la lectura completa del mismo:		
	Referencia	Motivo de exclusión
Azeredo et al. (2003)	No indica método de determinación del color	
Afik et al. (2006)	No describe un método de determinación de color, solamente asume que el color de las muestras es oscuro	
Freitas et al. (2006)	Consideran el color en función de la zona de origen de la miel pero no hacen ninguna determinación ni sensorial ni analítica	
Turkmen et al. (2006)	Consideran el color en función de la cantidad de pigmento marrón que se forma	
Sodré et al. (2007)	No indica método de determinación del color	

Tabla 4.2 Técnicas de determinación del color en la miel.

Método	Referencia	n	Otros datos de interés
Análisis sensorial	González-Viñas et al. (2003)	10	Llevado a cabo por 12 expertos catadores
	Carvalho et al. (2009)	8	Llevado a cabo por 30 expertos catadores
Método Pfund	Frankel et al. (1998)	19	Determina el color de muestras de miel de 14 espectros polínicos diferentes
	Devillers et al. (2004)	469	Estudian las características físico químicas de 7 tipos de mieles uniflorales con el objetivo de obtener un modelo de discriminación de las mismas
	Malacalza et al. (2005)	63	Estudian la relación lineal entre el color y las cenizas de las mieles de Buenos Aires
	Corbella y Cozzolino (2006)	30	Determina el color de muestras de miel de 6 espectros polínicos diferentes
	Al et al. (2009)	24	Concluyen que las mieles florales son más claras que las de mielada en términos de índice de color en la escala Pfund
Colorimetría	Gonzales et al. (1999)	16	Estudian el oscurecimiento de la miel durante el almacenamiento
	Negueruela y Pérez-Arquile (2000)	20	Estudian el color de las mieles de romero
	Ahmed et al. (2007)	7	Analizan mieles procedentes de India de diferentes espectros polínicos
Espectrofotometría	Huidobro y Simal (1984a)	115	Método que emplea cubetas de un centímetro de espesor y clasifica las mieles por índices de color basados en las absorbancias netas (560-720 nm)
	Mateo y Bosch-Reig (1998)	101	Indican que el color, junto con otros parámetros es una herramienta muy útil para clasificar las mieles uniflorales
	Anupama et al. (2003)	11	Observan que las muestras de miel solamente tienen componentes del amarillo y el rojo
	Atrouse et al. (2004)	8	La muestra se mezcla con una solución de caramelo-glicerina y se mide la absorbancia a 560 nm
	Beretta et al. (2005)	14	La muestra se diluye al 50% con agua, se somete a ultrasonidos durante 5 minutos y se filtra (0,45 µm). Se mide la absorbancia neta (diferencia entre 450 y 720 nm)
	Bulut y Kilic (2009)	3	La muestra se calienta a 55°C durante 10 minutos. Estudian el efecto del almacenamiento en el color de la miel, concluyendo que el oscurecimiento de las mieles durante el almacenamiento depende de la temperatura y de la composición de las mismas
Colorimetría y espectrofotometría	Terrab et al. (2002)	112	La muestra se homogeneiza a 40°C durante 1 hora, se filtra, se centrifuga (10 minutos a 3000 rpm) y se calienta de nuevo a 45-50°C para disolver los cristales de azúcar
	Soria et al. (2004)	46	Estudian varios parámetros con el objetivo de caracterizar las mieles de Madrid
Espectroradiometría de reflectancia difusa	Terrab et al. (2003a)	29	
	Terrab et al. (2003b)	12	La muestra se calienta a 45-50°C para disolver los cristales de azúcar. Aplican las ecuaciones que propone el CIELAB
	Terrab et al. (2003c)	20	
	Terrab et al. (2004a)	36	
	Montes et al. (2004)	NI	Escaneo del espectro de absorbancia y del espectro de reflectancia de las muestras
	González-Miret et al. (2005)	77	La muestra se calienta a 45-50°C para disolver los cristales de azúcar

NI: No indicado en el trabajo publicado

Terrab et al. (2002, 2003a, 2003b, 2003c y 2004a) analizan varios parámetros para su caracterización en numerosas muestras de diferentes espectros polínicos y procedentes de España o de Marruecos. El color de las mieles lo determinan mediante espectroradiometría de reflectancia difusa.

Por último, *González-Miret et al. (2005)* determinan el contenido mineral y el color de 77 mieles. Aplican una regresión lineal múltiple para establecer relaciones entre las coordenadas cromáticas del CIELAB y el contenido mineral obteniendo buenas correlaciones lineales. Además, mediante la aplicación de un análisis lineal discriminante, obtienen un modelo que clasifica correctamente las muestras de miel según su luminosidad en un 85% de los casos.

4.1.2 Parte experimental

4.1.2.1 Material y aparatos

- ⇒ Espectrofotómetro Kontron Unikov 922 UV-Vis de doble haz.
- ⇒ Centrífuga Megafuge 1.0. Heraeus Sepatech.
- ⇒ Baño Multitemp III. Pharmacia Biotech.
- ⇒ Cubetas de 1 cm de espesor apareadas.
- ⇒ Material de uso común en el laboratorio.

4.1.2.2 Procedimiento

La muestra se licua a 50°C durante 30 minutos en un baño. A continuación se centrifuga durante 15 minutos a 4000 rpm para eliminar las burbujas de aire, se vierte la miel en la cubeta y se efectúan las lecturas correspondientes frente a otra cubeta apareada que contiene agua destilada. Se realizan lecturas de porcentaje de transmitancia a 445, 495, 550 y 625 nm para el cálculo de la coordenadas tricromáticas y la longitud de onda dominante y lecturas de absorbancia a 560 y 720 nm para determinar la absorbancia neta y la turbidez (*Huidobro y Simal, 1984a*).

4.1.2.3 Cálculos y expresión de resultados

4.1.2.3.1 Parámetros del color

Para la determinación de los parámetros del color en las muestras de miel (coordenadas tricromáticas, absorbancia neta y turbidez) se ha seguido el método descrito por *Huidobro y Simal (1984a)*.

4.1.2.3.1.1 Coordenadas tricromáticas

A partir de la medida de la transmitancia a 445, 495, 550 y 625 nm, se establecen las coordenadas tricromáticas (x , y) del punto representativo del color de la miel en el diagrama de cromaticidad de la *Commission Internationale de l'Eclairage* (Fig 4.1) mediante las siguientes expresiones:

$$x = \frac{X}{X + Y + Z}$$

$$y = \frac{Y}{X + Y + Z}$$

donde:

$$X = 0,42 T_{625} + 0,35 T_{550} + 0,21 T_{445}$$

$$Y = 0,20 T_{625} + 0,63 T_{550} + 0,17 T_{495}$$

$$Z = 0,24 T_{495} + 0,94 T_{445}$$

Los valores X , Y y Z expresan las proporciones de los colores rojo, verde y azul.

4.1.2.3.1.2 Absorbancia neta

La absorbancia neta se calcula hallando la diferencia entre las absorbancias medidas a 560 y 720 nm (*Huidobro y Simal, 1984a*).

4.1.2.3.1.3 Turbidez

A partir de la medida de la absorbancia a 720 nm, se puede establecer la equivalencia en grados *Cloudy* de la escala de la AOAC (*Huidobro y Simal, 1984a*). Por ello se toma como medida de la turbidez la absorbancia a esta longitud de onda.

4.1.2.3.1.4 Precisión

Huidobro y Simal (1984a) comprobaron la precisión del método en una muestra de miel efectuando 10 medidas diferentes. El coeficiente de variación (RDS%) obtenido fue de 0,12, 0,094, 0,26 y 0,40 para las coordenadas tricromáticas x e y , la absorbancia neta y la turbidez, respectivamente.

Se hizo una comprobación con una de las muestras de miel de este trabajo y se obtuvieron resultados similares a los anteriores (RDS% de 0,070, 0,025, 0,25 y 0,40 para las coordenadas tricromáticas x e y , la absorbancia neta y la turbidez, respectivamente).

4.1.2.3.2 Cromaticidad

Para expresar la cromaticidad se utiliza el parámetro longitud de onda dominante cuyo valor se obtiene mediante la siguiente fórmula (Heredia y Guzmán, 1992):

$$\lambda_D = \frac{616,5372 + 7193,0947 m + 18360,3963 m^2 - 396,3129 m^3}{1 + 11,9328 m + 31,7620 m^2}$$

donde:

$m = (y - y_0) / (x - x_0)$, siendo x e y las coordenadas tricromáticas de la muestra de miel y x_0 e y_0 las coordenadas del punto del punto 0 ($x_0 = 0,3101$, $y_0 = 0,3163$)

4.1.3 Resultados y discusión

4.1.3.1 Métodos

4.1.3.1.1 Determinación de la longitud de onda dominante

En relación con la determinación de la longitud de onda dominante, normalmente, se recurre al diagrama de cromaticidad de la *Commission Internationale de l'Eclairage* (Fig. 4.1).

En primer lugar, se representa la muestra en el diagrama con los valores de las coordenadas tricromáticas x e y . Una vez representada la muestra, la longitud de onda dominante se establece uniendo con una recta, el punto 0 del

diagrama y el punto que representa a la muestra a partir de los valores de x e y . El punto de intersección de la recta con la línea diagonal del diagrama, proporciona el valor de la longitud de onda dominante. Este procedimiento implica la representación gráfica de todas las muestras sobre el diagrama de cromaticidad lo que supone un trabajo tedioso con la posibilidad de error en la representación.

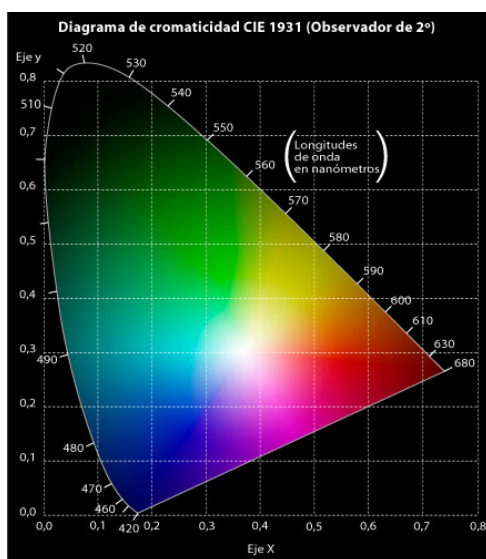


Figura 4.1 Diagrama de cromaticidad de la Commission Internationale de l'Eclairage (Westland, 2009).

Heredia y Guzmán (1992), con el fin de simplificar el sistema de cálculo de este parámetro, obtuvieron la longitud de onda dominante del color de los vinos mediante una fórmula cuya única variable es el valor de la pendiente que resulta de la unión del punto definido por las coordenadas tricromáticas y del punto 0.

En este trabajo se propone aplicar esta fórmula, que fue desarrollada en vinos a las muestras de miel. Para ello, con el objeto de comprobar su validez, se ha calculado la longitud de onda dominante en 10 muestras de miel mediante los dos métodos: la representación gráfica en el diagrama de cromaticidad y el cálculo con la fórmula desarrollada por *Heredia y Guzmán (1992)*. Se han comparado los resultados obtenidos y se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos. El análisis estadístico realizado para llegar a esta conclusión se resume en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3

Análisis estadístico en el que se comparan los resultados obtenidos al calcular la longitud de onda dominante gráficamente o mediante la fórmula propuesta por *Heredia y Guzmán (1992)*.

Parámetro	Cálculo gráfico	Cálculo fórmula	Test estadístico (95% confianza)	Resultado	Conclusión
n	10	10	-	-	-
Promedio	597,3	597,7	t – Student	p = 0,912 ⁽¹⁾	Sin diferencias estadísticamente significativas
Desviación estándar	9,632	9,236	-	-	-
Varianza	92,78	85,31	F- test	p = 0,902 ⁽²⁾	Sin diferencias estadísticamente significativas
Coficiente de Curtosis	-0,354	-0,558	-	-	Distribuciones normales
Mediana	595,8	596,2	Wilcoxon-Mann-Whitney	p= 0,791	Sin diferencias estadísticamente significativas
Comparación de la distribución de las muestras			Kolmogorov-Smirnov	p= 0,988	Sin diferencias estadísticamente significativas

⁽¹⁾ Asumiendo igualdad de varianzas

⁽²⁾ Asumiendo distribuciones normales

Por ello, y debido a la simplicidad y consistencia que confiere a los resultados obtenidos, se ha calculado la longitud de onda dominante mediante la fórmula propuesta por *Heredia y Guzmán (1992)*.

4.1.3.2 Muestras

El color de las 125 muestras de miel analizadas se expresa en términos de coordenadas tricromáticas (x e y), longitud de onda dominante, absorbancia neta y turbidez. En la Figura 4.2 y en la Tabla 4.4 se muestran los valores obtenidos y la distribución de cada uno de estos parámetros en las muestras analizadas.

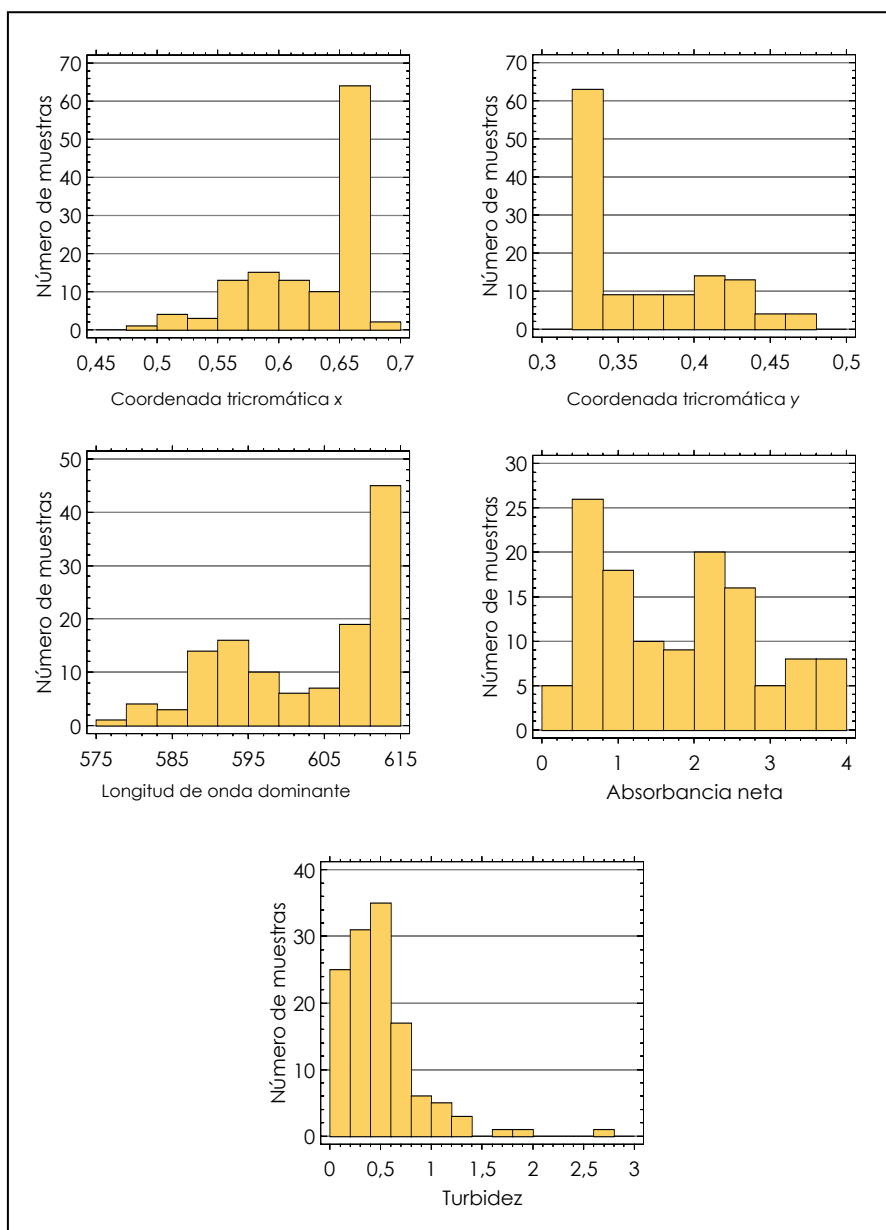


Figura 4.2 Distribución de los parámetros del color y la turbidez en las muestras de miel analizadas.

Como se puede observar en esta figura, cuando una miel posee un valor alto en la coordenada tricromática x , el valor de la coordenada tricromática y es bajo. Este hecho se puede explicar mediante el diagrama de cromaticidad (Fig. 4.1), ya que cuando el color de la miel se va oscureciendo se observan valores elevados de la coordenada tricromática x y valores bajos en la coordenada tricromática y .

Tabla 4.4 Resultados de color obtenidos para el total de las muestras analizadas.

Parámetro	Promedio \pm SD	Vmín-Vmáx
x	0.630 ± 0.049	$0.479 - 0.675$
y	0.364 ± 0.044	$0.321 - 0.468$
Longitud de onda dominante	603.1 ± 10.5	$578.6 - 614.3$
Absorbancia neta	1.784 ± 1.038	$0.235 - 3.931$
Turbidez	0.504 ± 0.378	$0.112 - 2.663$

Si se comparan estos resultados con los que han obtenido otros autores que han utilizado la misma metodología (Tabla 4.5), se puede observar que los valores de las coordenadas tricromáticas x e y , longitud de onda dominante y turbidez son similares. Sin embargo, en el caso del parámetro absorbancia neta, los valores obtenidos en este trabajo son más elevados que los encontrados por otros autores, sobre todo si se comparan con los obtenidos por *Soria et al.* (2004).

Tabla 4.5

Resultados obtenidos por otros autores que utilizan técnicas espectrofotométricas para la determinación del color en muestras de miel.

Referencia	n	Parámetro analizado	Promedio \pm SD	(V _{mín} -V _{máx})
<i>Huidobro y Simal (1984a)</i>	115	Coordenada tricromática x	0,572 \pm 0,051	(0,441 - 0,663)
		Coordenada tricromática y	0,411 \pm 0,034	(0,337 - 0,464)
		Longitud de onda dominante	591,6 \pm 7,580	(394,3 - 609,6)
		Absorbancia neta	0,843 \pm 0,384	(0,210 - 1,650)
		Turbidez	0,464 \pm 0,226	(0,123 - 1,140)
<i>Mateo y Bosch-Reig (1998)</i>	101	Coordenada tricromática x	0,487 \pm 0,108	(0,340 - 0,640)
		Coordenada tricromática y	0,414 \pm 0,051	(0,265 - 0,488)
<i>Soria et al. (2004)</i>	46	Coordenada tricromática x	-	(0,347 - 0,558)
		Coordenada tricromática y	-	(0,362 - 0,462)
		Absorbancia neta	-	(0,053 - 0,706)
		Turbidez	-	(0,061 - 2,961)

A continuación se estudiarán los resultados obtenidos en las muestras analizadas teniendo en cuenta, en primer lugar, el origen botánico de las mismas, y en un segundo caso, su origen geográfico.

4.1.3.2.1 Resultados obtenidos según el origen botánico

En la Tabla 4.6 se puede observar que los resultados obtenidos según el origen botánico son bastante heterogéneos para todos los parámetros estudiados.

Tabla 4.6

Parámetros del color en las muestras analizadas agrupadas según su origen botánico.

Origen botánico	N	Coordenada tricromática x	Coordenada tricromática y	Longitud de onda dominante	Absorbancia neta	Turbidez
<i>Castanea sativa</i> Miller	4	0,672 ± 0,002 (0,670 – 0,674)	0,326 ± 0,003 (0,322 – 0,329)	612,8 ± 1,07 (611,5 – 614,0)	2,829 ± 0,607 (2,130 – 3,931)	0,505 ± 0,117 (0,374 – 0,647)
<i>Citrus</i> sp.	2	0,533 ± 0,037 (0,507 – 0,559)	0,443 ± 0,020 (0,429 – 0,456)	585,4 ± 4,55 (582,2 – 588,6)	0,508 ± 0,186 (0,376 – 0,639)	0,150 ± 0,053 (0,112 – 0,188)
<i>Diplotaxis</i> sp.	1	0,605	0,347	604,7	1,232	2,663
<i>Echium</i> sp.	1	0,590	0,407	592,8	0,783	0,194
<i>Erica</i> sp.	2	0,670 ± 0,004 (0,667 – 0,673)	0,327 ± 0,006 (0,322 – 0,331)	612,5 ± 2,12 (611,0 – 614,0)	2,504 ± 0,468 (2,173 – 2,835)	0,954 ± 0,118 (0,871 – 1,038)
<i>Eucalyptus</i> sp.	25	0,590 ± 0,050 (0,479 – 0,670)	0,402 ± 0,040 (0,329 – 0,467)	594,1 ± 8,84 (578,6 – 611,6)	0,948 ± 0,550 (0,253 – 2,366)	0,262 ± 0,131 (0,125 – 0,600)
<i>Lavandula</i> sp.	4	0,601 ± 0,037 (0,566 – 0,650)	0,396 ± 0,035 (0,350 – 0,428)	595,3 ± 7,16 (589,0 – 605,1)	0,935 ± 0,397 (0,600 – 1,497)	0,209 ± 0,056 (0,168 – 0,292)
<i>Rosmarinus</i> sp.	6	0,566 ± 0,032 (0,507 – 0,597)	0,423 ± 0,021 (0,400 – 0,461)	589,6 ± 4,30 (581,8 – 594,0)	0,672 ± 0,178 (0,350 – 0,837)	0,201 ± 0,047 (0,119 – 0,257)
<i>Rosmarinus</i> sp. y <i>Trifolium</i> sp.	1	0,602	0,395	594,9	0,910	0,237
<i>Rubus</i> sp.	1	0,673	0,322	614,0	3,797	0,780
<i>Trifolium</i> L. sp.	2	0,614 ± 0,072 (0,563 – 0,666)	0,381 ± 0,067 (0,333 – 0,428)	599,4 ± 14,9 (588,9 – 610,0)	1,327 ± 1,018 (0,608 – 2,047)	0,311 ± 0,176 (0,186 – 0,435)
Multifloral	74	0,650 ± 0,035 (0,519 – 0,675)	0,347 ± 0,034 (0,321 – 0,462)	607,3 ± 8,2 (582,5 – 614,4)	2,171 ± 0,968 (0,342 – 3,914)	0,604 ± 0,340 (0,118 – 1,883)
multifloral y de mielada	2	0,666 ± 0,001 (0,666 – 0,667)	0,333 ± 0,001 (0,332 – 0,334)	610,2 ± 0,42 (609,9 – 610,5)	2,071 ± 0,096 (2,003 – 2,139)	0,469 ± 0,040 (0,441 – 0,497)

Promedio ± SD (V_{mín}-V_{máx})

Las mieles con valores altos de longitud de onda dominante y de absorbancia neta son las de *Castanea sativa* Miller, *Erica* sp., *Rubus*, sp. y multifloral y de mielada, es decir, mieles de color oscuro predominantemente.

Por último, la muestra de *Diplotaxis* sp. tiene una turbidez muy superior al resto.

4.1.3.2.2 Resultados obtenidos según el origen geográfico de procedencia del envasador

Se han agrupado las muestras en función de la comunidad autónoma de origen y, en el caso de las muestras de Galicia, además, se han dividido según la provincia del envasador. Los resultados se muestran en la Tabla 4.7 y en la Figura 4.3.

Tabla 4.7 Parámetros del color en las muestras analizadas agrupadas según su comunidad autónoma de origen.

Comunidad autónoma	n	Coordenada tricromática x	Coordenada tricromática y	Longitud de onda dominante	Absorbancia neta	Turbidez
Castilla La Mancha	7	0,578 ± 0,035 (0,507 – 0,608)	0,415 ± 0,024 (0,391 – 0,461)	591,2 ± 4,85 581,8 – 595,9	0,726 ± 0,202 0,350 – 0,922	0,188 ± 0,035 0,119 – 0,237
Castilla y León	33	0,617 ± 0,048 (0,507 – 0,674)	0,377 ± 0,043 (0,322 – 0,462)	599,7 ± 9,71 582,2 – 614,0	1,338 ± 0,762 0,342 – 3,344	0,573 ± 0,543 0,112 – 2,663
Comunidad Valenciana	8	0,613 ± 0,047 (0,559 – 0,670)	0,383 ± 0,044 (0,329 – 0,429)	598,7 ± 10,1 588,6 – 611,6	1,294 ± 0,731 0,639 – 2,282	0,351 ± 0,150 0,188 – 0,600
Extremadura	2	0,670 ± 0,005 (0,667 – 0,673)	0,328 ± 0,007 (0,322 – 0,333)	612,1 ± 2,59 610,3 – 613,9	2,602 ± 0,688 2,116 – 3,089	0,674 ± 0,271 0,483 – 0,866
Galicia	75	0,641 ± 0,047 (0,479 – 0,675)	0,353 ± 0,042 (0,321 – 0,467)	605,9 ± 10,0 578,6 – 614,3	2,110 ± 1,071 0,253 – 3,931	0,514 ± 0,306 0,125 – 1,777

Promedio ± SD (V_{mín}-V_{máx})

En la Tabla 4.7 se puede observar que las mieles procedentes de Extremadura y de Galicia presentan los valores medios más elevados en longitud de onda dominante y absorbancia neta. Por el contrario, las mieles de Castilla La Mancha presentan los valores medios más bajos en estos parámetros y también de la coordenada tricromática x y de la turbidez.

Finalmente, la Figura 4.3 muestra como dentro de las mieles de Galicia las que proceden de Ourense presentan valores medios altos en longitud de onda dominante, absorbancia neta y turbidez. Sin embargo, son las muestras de A Coruña las que presentan los valores medios más bajos de estos parámetros.

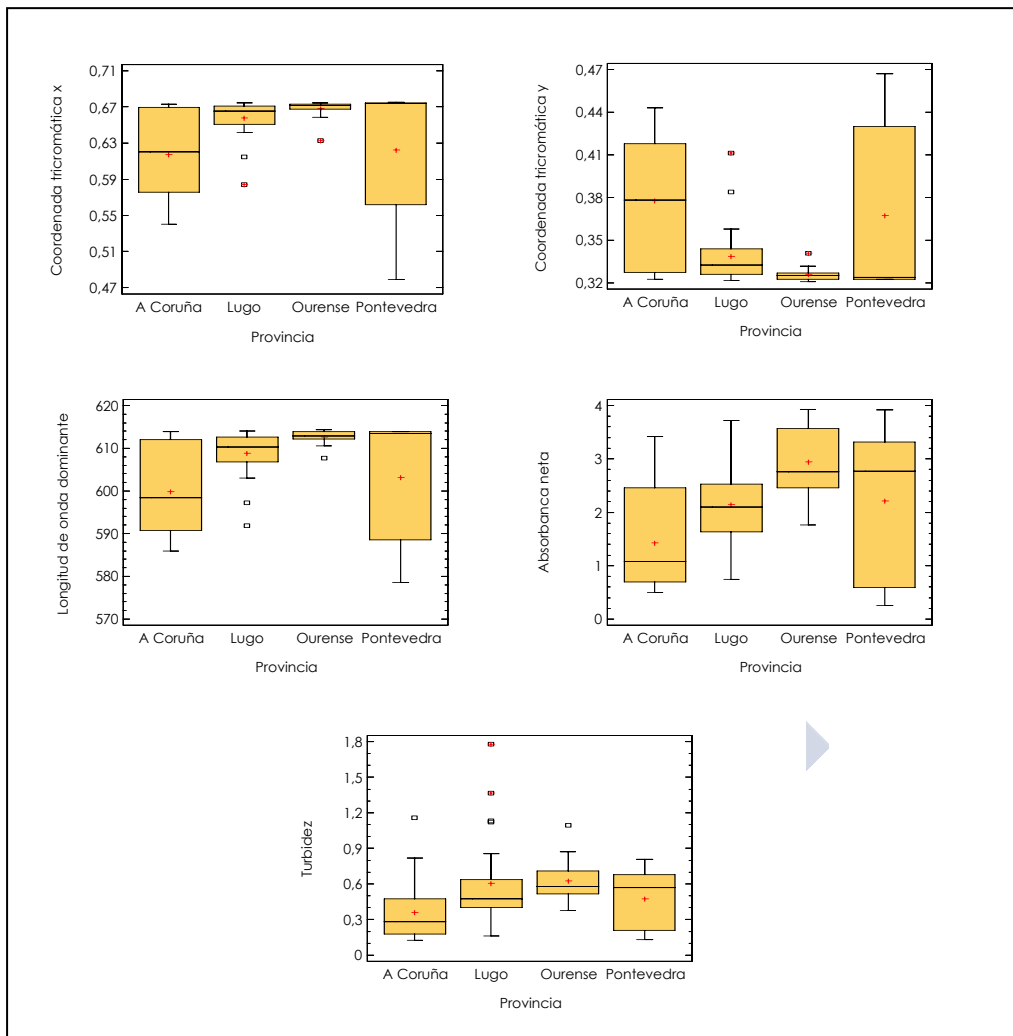


Figura 4.3 Parámetros del color en las muestras gallegas analizadas clasificadas según la provincia del envasador.

4.2 CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

La conductividad eléctrica es un parámetro de la miel relacionado fundamentalmente con el contenido en sales minerales. Se define como la propiedad física en la que se determina la capacidad de una solución de miel para conducir la corriente eléctrica.

Se ha comprobado que la conductividad eléctrica es directamente proporcional al contenido en cenizas y a la acidez de la miel, siendo tanto mayor cuanto más elevados son estos valores (*Vorwohl, 1964*). *Sancho et al. (1991a)* establecieron una relación entre la conductividad eléctrica (10^{-4} S/cm) y el contenido en cenizas (g/100 g miel). *Bianchi (1992)* y *Sanz et al. (1994)* encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre ambos parámetros. El contenido en cenizas es un criterio de calidad que depende del origen botánico de la miel. Actualmente este análisis se ha reemplazado en la legislación por la conductividad eléctrica al tratarse de una determinación más rápida y sencilla (*DOCE, 2002; BOE, 2003*).

Se trata del parámetro de calidad de la miel más útil para la clasificación de las mieles uniflorales que puede ser determinado con instrumentación sencilla y barata (*Bogdanov et al., 2004*). Además se puede utilizar para diferenciar entre las mieles florales y las de mielada (*Vela et al., 2007*).

4.2.1 Antecedentes bibliográficos

Vorwohl (1964) propuso determinar la conductividad eléctrica a 20°C en soluciones al 20% en materia seca y la mayoría de los investigadores han medido la conductividad eléctrica de la miel siguiendo este procedimiento. Actualmente se encuentra recogido entre los métodos estandarizados de la Comisión Europea de la Miel (*Bogdanov et al., 1997*) siendo oficial en España (*BOE, 1986*) y en numerosos países (*Codex Alimentarius, 2001*).

Posteriormente, *Sancho et al. (1991b)* simplificaron la medida de este parámetro al encontrar una relación lineal entre la conductividad eléctrica de la miel al 20% en materia seca (*Vorwohl, 1964*) y la conductividad en materia húmeda obtenida al disolver 10,00 g de miel en 75 ml de agua (*White, 1962*). Esta relación tiene un coeficiente de correlación lineal de 0,9998 y consiste en multiplicar el valor obtenido en esta última solución de miel por 1,50 para obtener

la conductividad eléctrica al 20% en materia seca. Algunos autores han optado por determinar la conductividad eléctrica utilizando esta simplificación (*Soria et al., 2004*).

4.2.2 Parte experimental

4.2.2.1 Fundamento

Mediante un puente de Wheatstone y una célula de conductividad apropiada se determina la conductividad eléctrica a 20°C comparando la muestra con una solución de cloruro potásico.

4.2.2.2 Material y aparatos

- ⇒ Conductímetro Radiometer Copenhagen CDM 2e N° 187049.
- ⇒ Electrodo Radiometer Copenhagen Tipo CDC 104 de 1,0 cm.
- ⇒ Baño ultratermostático Haake Tipo NBS.
- ⇒ Termómetro Jeaner Normalglas de 100°C con sensibilidad de $\pm 0,1^\circ\text{C}$.
- ⇒ Material de uso común en el laboratorio.

4.2.2.3 Reactivos

- Cloruro de potasio p.a. ACS ISO Merck Art. 104933.
- Agua Milli-Q Millipore.

4.2.2.4 Procedimiento

El conductímetro se calibra con soluciones de cloruro de potasio a 20°C mediante el procedimiento de la Comisión Internacional de la Miel (*Bogdanov et al., 1997*).

Se disuelven 10,00 g de miel en 75 mL de agua Milli-Q y se mide directamente la conductividad eléctrica a 20°C (*Sancho et al., 1991b*).

4.2.2.5 Cálculos y expresión de resultados

Para comparar los resultados con los de otros autores se ha multiplicado la conductividad en materia húmeda obtenida por 1,50, expresando la conductividad eléctrica en materia seca, según la relación encontrada por *Sancho et al. (1991b)*.

La conductividad eléctrica en la miel se ha expresado en mS/cm que son las unidades utilizadas en la legislación europea (*DOCE, 2002*).

4.2.2.6 Precisión

Sancho et al. (1991b) estudiaron la precisión del método utilizado obteniendo un coeficiente de variación (RSD%) de 0,86%.

4.2.3 Resultados y discusión

Se han analizado 125 mieles en las que se ha obtenido un valor promedio de conductividad eléctrica de 0,597 mS/cm. El rango se encuentra entre 0,155 y 2,025 mS/cm. En la Figura 4.4 se muestra la distribución de la conductividad eléctrica en las muestras analizadas.

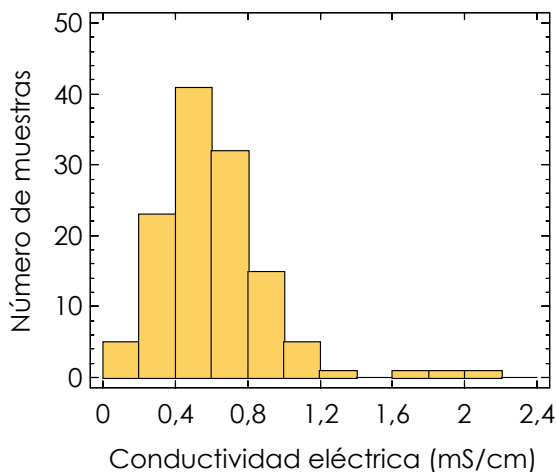


Figura 4.4 Distribución de la conductividad eléctrica en las muestras de miel analizadas.

Todas las muestras analizadas cumplen con la legislación vigente (*DOCE, 2002; BOE, 2003*). Las muestras de *Castanea sativa* Miller y las de mezcla multiflora y de mielada presentan valores de conductividad eléctrica superiores a 0,8 mS/cm. Los valores de conductividad eléctrica de las muestras de *Erica* sp. son variables. El resto de mieles muestran valores inferiores a 0,8 mS/cm, excepto en el caso de cuatro muestras multiflorales que tienen valores de conductividad superiores. Estas muestras, aunque son multiflorales, presentan una elevada proporción de pólenes de *Castanea sativa* Miller por lo que

cumplirían la legislación vigente ya que se pueden englobar en el grupo de mieles con mezcla de castaño, lo que implica que su conductividad eléctrica debe ser superior a 0,8 mS/cm (DOCE, 2002; BOE, 2003).

4.2.3.1 Comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los publicados por otros autores

La conductividad eléctrica de la miel ha sido determinada por un gran número de autores. En la Tabla 4.8 se resumen los resultados obtenidos por algunos de ellos agrupados en función del país de origen de las muestras de miel.

Tabla 4.8 Conductividad eléctrica de las mieles determinadas por otros autores y clasificadas según su país de origen. Se muestra el contenido mínimo y máximo en mS/cm.

País	Autores	n	Conductividad eléctrica
Argelia	Ouchemoukh et al. (2007)	11	0,210 – 1,610
Argentina	Malacalza et al. (2005); Acquarone et al. (2007)	82	0,070 – 0,707
Brasil	Sodré et al. (2007); Dos Santos et al. (2008); Carvalho et al. (2009)	80	0,192 – 1,212
Croacia	Saric et al. (2008)	254	0,110 – 1,620
España	14 Referencias ^[1]	650	0,066 – 1,515
Francia	Devillers et al. (2004)	469	0,870 – 1,403
Irlanda	Downey et al. (2005)	50	0,110 – 0,480
Italia	Fallico et al. (2004); Spano et al. (2008)	13 ^[2]	0,126 – 1,128
Marruecos	Terrab et al. (2003a, 2003b, 2003c, 2003d y 2003e); Díez et al. (2004)	252	0,136 – 2,400
Nepal	Joshi et al. (2000)	81	0,310 – 0,960
Nigeria	Adebisi et al. (2004)	5	0,009 – 0,173
Pakistán	Khan et al. (2006)	15	0,270 – 0,370
Polonia	Przybyłowski y Wilczynska (2001); Popek, (2002, 2003a y 2003b)	264	0,140 – 1,088
Portugal	Andrade et al. (1999)	60	0,290 – 0,741
República Checa	Chelechovska y Vorlová (2001)	30	0,112 – 1,292
Suiza	Ruoff et al. (2007)	421	0,100 – 1,699
Turquía	Sahinler et al. (2004)	50	0,188 – 0,590
Uruguay	Cozzolino y Corbella (2003); Corbella y Cozzolino (2006)	140	0,200 – 1,440

^[1] Referencias de España: Sancho et al. (1991a); Peña Crecente y Herrero Latorre (1993); Pérez-Arquillué et al. (1994 y 1995); López et al. (1996); San Juan et al. (1997); Mateo y Bosch-Reig (1998); Gómez Báez et al. (2000); González-Paramás et al. (2000); Serra Bonvehí et al. (2004); Serrano et al. (2004); Soria et al. (2004); Terrab et al. (2004b); Vela et al. (2007).

^[2] No se indica el número de muestras en el trabajo publicado por Fallico et al. (2004)

Además de las referencias que se muestran en la tabla, cabe destacar un trabajo en el que se han recopilado datos de varios parámetros físico químicos de 5.484 mieles europeas en las que se ha obtenido un rango de conductividad eléctrica comprendido entre 0,080 y 2,090 mS/cm (*Persano Oddo y Piro, 2004*). Por último, cabe mencionar un trabajo en el que aparecen los resultados de conductividad eléctrica en 152 muestras de miel procedentes de varios países americanos (Brasil, Costa Rica, México, Panamá, Surinam, Trinidad & Tobago y Venezuela) en los que se han obtenido valores de conductividad eléctrica entre 0,490 y 8,770 mS/cm (*Souza et al., 2006*).

Al comparar los datos obtenidos en este trabajo con los obtenidos por otros autores, se observa que la conductividad eléctrica de las muestras de miel analizadas se encuentra en el rango de conductividad de las mieles europeas (*Persano Oddo y Piro, 2004*) y es similar a otras muestras de miel españolas.

4.2.3.2 Resultados obtenidos según el origen botánico de las mieles

En la Tabla 4.9 se pueden observar los resultados obtenidos en las muestras analizadas agrupados según su origen botánico.

Tabla 4.9 Conductividad eléctrica de las muestras analizadas agrupadas según su origen botánico.

Origen botánico	n	Conductividad eléctrica (mS/cm)
<i>Castanea sativa</i> Miller	4	1,442 ± 0,558 (0,900 – 2,025)
<i>Citrus</i> sp.	2	0,182 ± 0,002 (0,180 – 0,183)
<i>Diplotaxis</i> sp.	1	0,269
<i>Echium</i> sp.	1	0,269
<i>Erica</i> sp.	2	0,945 ± 0,195 (0,807 – 1,083)
<i>Eucalyptus</i> sp.	25	0,475 ± 0,084 (0,360 – 0,723)
<i>Lavandula</i> sp.	4	0,458 ± 0,193 (0,294 – 0,719)
<i>Rosmarinus</i> sp.	6	0,252 ± 0,097 (0,155 – 0,405)
<i>Rosmarinus</i> y <i>Trifolium</i> sp.	1	0,756
<i>Rubus</i> sp	1	0,705
<i>Trifolium</i> L. sp.	2	0,298 ± 0,137 (0,201 – 0,395)
Multifloral	74	0,636 ± 0,254 (0,170 – 1,737)
Multifloral y de mielada	2	0,884 ± 0,164 (0,768 – 1,001)

Promedio ± SD (V_{mín}-V_{máx})

En esta tabla destaca el elevado valor medio de conductividad eléctrica que muestran las mieles de *Castanea sativa* Miller. Por el contrario se han encontrado valores muy bajos de conductividad eléctrica en las muestras de *Citrus sp.*, *Diplotaxis sp.*, *Rosmarinus sp.*, *Echium, sp.* y *Trifolium sp.* lo que concuerda con los resultados obtenidos por otros autores (Pérez-Arquillué *et al.*, 1994; Mateo y Bosch-Reig, 1998; Terrab *et al.*, 2003c; Persano Oddo y Piro, 2004).

4.2.3.3 Resultados obtenidos según el origen geográfico de procedencia del envasador de las muestras de miel

Estos resultados se han agrupado, en primer lugar en función de la comunidad autónoma de origen del envasador y se resumen en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10 Conductividad eléctrica de las muestras analizadas agrupadas según la comunidad autónoma de procedencia del envasador.

Origen geográfico	n	Conductividad eléctrica (mS/cm)
Castilla La Mancha	7	0,396 ± 0,185 (0,189 – 0,756)
Castilla y León	33	0,512 ± 0,291 (0,155 – 1,203)
Comunidad Valenciana	8	0,495 ± 0,316 (0,183 – 0,968)
Extremadura	2	0,812 ± 0,454 (0,491 – 1,133)
Galicia	75	0,658 ± 0,298 (0,360 – 2,025)

Promedio ± SD (V_{mín}-V_{máx})

La conductividad eléctrica media de las muestras de Galicia y de Extremadura es superior a la observada en el resto de las mieles españolas siendo las procedentes de Castilla La Mancha las que presentan los valores medios más bajos.

Las muestras de Galicia han sido clasificadas, en segundo lugar, según la provincia de la que procede el envasador. Los resultados aparecen en la Figura 4.5.

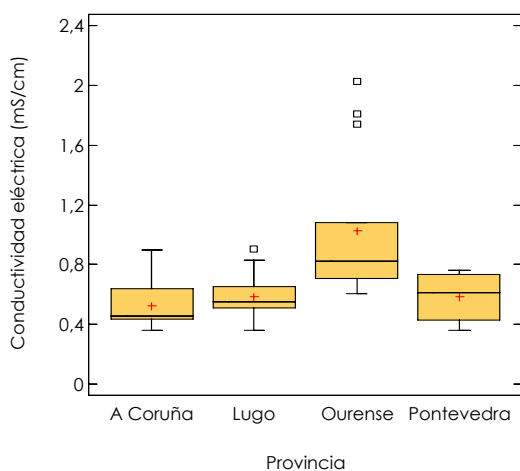


Figura 4.5. Conductividad eléctrica de las muestras gallegas analizadas agrupadas según el origen geográfico del envasador.

En esta figura se muestra como la conductividad eléctrica media de las mieles de Ourense es más elevada que la de las mieles del resto de Galicia posiblemente debido a que las muestras de *Castanea sativa* Miller, con una conductividad eléctrica más elevada (Tabla 4.9), proceden de esta provincia. En las otras tres provincias el valor promedio de conductividad eléctrica es similar.

4.3 pH

El pH es un indicador de contaminación microbiológica y tiene gran relevancia durante la extracción y el almacenamiento de la miel porque está relacionado con la vida útil de la misma (Conti, 2000). La mayoría de las bacterias y mohos crecen en medio ligeramente alcalino y neutro, mientras que las levaduras requieren un ambiente ácido (Conti et al., 1998).

Todas las mieles son ácidas debido a la presencia de ácidos orgánicos que contribuyen al sabor y a la estabilidad evitando el deterioro microbiano (Bogdanov et al., 2004).

El pH de la miel tiene cierto poder discriminatorio entre mieles de diferente origen floral obteniéndose diferentes valores de pH para las mieles de *Castanea sativa* Miller y de *Citrus* sp. (Persano Oddo y Piro, 2004).

4.3.1 Antecedentes bibliográficos

En toda la bibliografía consultada el pH de las muestras de miel ha sido determinado potenciométricamente. El método que se utiliza con mayor frecuencia es el descrito por White (1962) para la determinación del pH y los tipos de acidez. Este procedimiento es oficial "Final Action" en la AOAC desde 1977 y se considera el método oficial en España (BOE, 1986).

En la mayoría de los casos, la medida del pH es efectuada en materia húmeda. Sin embargo, Sancho et al. (1991c) demuestran en un estudio llevado a cabo en 115 mieles del País Vasco que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la medida del pH en materia seca y en materia húmeda.

4.3.2 Parte experimental

4.3.2.1 Fundamento

El pH se determina midiendo el potencial eléctrico que se crea en la membrana de un electrodo de vidrio, que es función de la actividad de los iones hidrógeno a ambos lados de la membrana, usando como referencia un electrodo de calomelanos.

4.3.2.2 Material y aparatos

- ⇒ pHmetro Sentron 1001.
- ⇒ Agitador magnético Selecta Agimatic-S.
- ⇒ Material de uso común en el laboratorio.

4.3.2.3 Procedimiento

Este parámetro se ha determinado mediante el método oficial en España (BOE, 1986). Consiste en disolver 10,00 g de miel en 75 mL de agua destilada exenta de dióxido de carbono en un vaso de precipitados de 250 mL. Esta solución se mantiene en agitación con un agitador magnético y se mide el pH introduciendo en ella el electrodo. La determinación se ha realizado por duplicado.

4.3.2.4 Precisión

La precisión de este método fue comprobada por Huidobro y Simal (1984b) obteniendo un coeficiente de variación (RSD%) de 0,60%.

4.3.3 Resultados y discusión

En las 125 mieles analizadas se ha obtenido un valor promedio de pH de 4,09 con un rango entre 3,59 y 5,44. En la Figura 4.6 se muestra la distribución del pH en las muestras de miel.

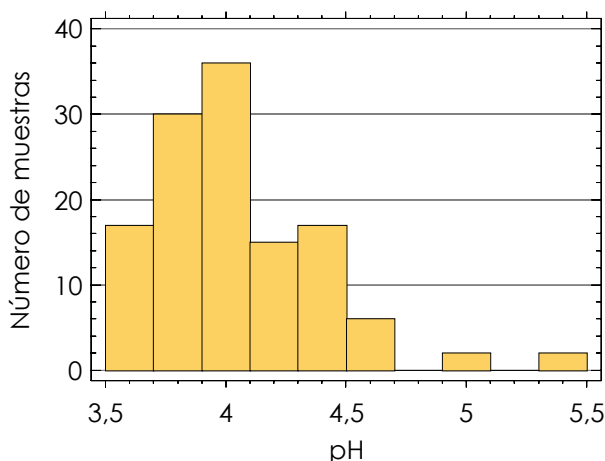


Figura 4.6 Distribución del pH en las muestras de miel analizadas.

4.3.3.1 Comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los publicados por otros autores

El pH de la miel ha sido determinado por un elevado número de autores. En la Tabla 4.11 se resumen los resultados obtenidos por algunos de ellos agrupados en función del país de origen de las muestras de miel.

Tabla 4.11

Valores de pH de las mieles determinadas por otros autores y clasificadas según su país de origen. Se muestran los contenidos mínimo y máximo.

País	Autores	n	pH
Arabia Saudí	Al-Khalifa y Al-Arifly (1999); Osman et al. (2007)	10 ^[1]	3,70 – 6,06
Argelia	Ouchemoukh et al. (2007)	11	3,49 – 4,43
Argentina	Malacalza et al. (2005); Acquarone et al. (2007); Baroni et al. (2009)	157	3,10 – 5,80
Brasil	Sodré et al. (2007); Welke et al. (2008); Carvalho et al. (2009)	64	3,30 – 6,64
España	16 Referencias ^[2]	680	3,20 – 5,21
Francia	Devillers et al. (2004)	469	4,74 – 5,79
India	Anupama et al. (2003); Ahmed et al. (2007)	18	3,62 – 5,46
Irlanda	Downey et al. (2005)	50	3,75 – 4,61
Israel	Dag et al. (2006)	48	3,80 – 5,20
Italia	Fallico et al. (2004); Spano et al. (2008)	13 ^[3]	3,21 – 5,90
Marruecos	Terrab et al. (2003a, 2003b, 2003c, 2003d y 2003e); Díez et al. (2004)	252	2,25 – 4,49
Nepal	Joshi et al. (2000)	81	3,52 – 3,68
Nigeria	Adebiyi et al. (2004)	5	4,31 – 6,02
Pakistán	Khan et al. (2006)	15	3,29 – 4,05
Polonia	Popek (2002 y 2003b)	186	3,67 – 4,24
Portugal	Andrade et al., 1999)	60	3,60 – 4,46
República Checa	Chelechovska y Vorlová, 2001)	30	3,16 – 4,76
Suiza	Ruoff et al. (2007)	421	3,50 – 6,10
Turquía	Yilmaz y Yavuz (1999); Sahinler et al. (2004); Turhan (2007)	120	3,60 – 4,60
Uruguay	Cozzolino y Corbella (2003); Corbella y Cozzolino (2006)	140	2,57 – 6,03

^[1] No se indica el número de muestras en el trabajo publicado por Osman et al. (2007)

^[2] Referencias de España: Sancho et al., (1991c); Peña Crecente y Herrero Laforte (1993); Pérez-Arquillué et al. (1994 y 1995); López et al. (1996); San Juan et al. (1997); Mateo y Bosch-Reig (1998); Gómez Báez et al. (2000); González-Paramás et al. (2000); Cavia et al. (2002); Serra Bonvehí et al. (2004); Serrano et al. (2004); Soria et al. (2004); Terrab et al. (2004b); Terrab y Heredia (2004); Vela et al. (2007).

^[3] No se indica el número de muestras en el trabajo publicado por Fallico et al. (2004)

Cuando se comparan los valores de las mieles objeto de este trabajo con los obtenidos por otros autores, se observa que los valores de pH de las muestras de miel analizadas son similares a los de las mieles españolas.

Además de las publicaciones que se muestran en la Tabla 4.11, cabe destacar un trabajo en el que se determina el pH de 152 muestras de miel procedentes de varios países americanos (Brasil, Costa Rica, México, Panamá, Surinam, Trinidad & Tobago y Venezuela) obteniéndose valores comprendidos entre 3,15 y 4,66 (Souza *et al.*, 2006).

4.3.3.2 Resultados obtenidos según el origen botánico de las mieles

En la Tabla 4.12 se pueden observar los resultados obtenidos en las muestras analizadas agrupados según el origen botánico de las mismas.

Tabla 4.12 Valores de pH de las muestras analizadas agrupadas según su origen botánico.

Origen botánico	n	pH
<i>Castanea sativa</i> Miller	4	4,87 ± 0,64 (4,10 – 5,44)
<i>Citrus</i> sp.	2	3,82 ± 0,08 (3,76 – 3,87)
<i>Diplotaxis</i> sp.	1	3,93
<i>Echium</i> sp.	1	3,71
<i>Erica</i> sp.	2	4,27 ± 0,37 (4,00 – 4,53)
<i>Eucalyptus</i> sp.	25	4,12 ± 0,30 (3,72 – 5,00)
<i>Lavandula</i> sp.	4	4,19 ± 0,35 (3,80 – 4,54)
<i>Rosmarinus</i> sp.	6	3,98 ± 0,29 (3,71 – 4,49)
<i>Rosmarinus</i> y <i>Trifolium</i> sp.	1	4,42
<i>Rubus</i> sp.	1	4,10
<i>Trifolium</i> L. sp.	2	3,60 ± 0,01 (3,59 – 3,60)
Multifloral	74	4,05 ± 0,30 (3,60 – 5,12)
Multifloral y de mielada	2	4,56 ± 0,11 (4,48 – 4,64)

Promedio ± SD (V_{mín}–V_{máx})

Las mieles de *Castanea sativa* Miller y las de mezcla de multiflora y mielada muestran los valores más elevados de pH mientras que las mieles de *Citrus*, sp., *Echium*, sp. y *Trifolium*, sp. son las que presentan los valores más bajos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Mateo y Bosch-Reig, 1998; Persano Oddo y Piro, 2004; Corbella y Cozzolino, 2006; Vela et al., 2007). Finalmente, como cabría esperar, las mieles multiflorales presentan el rango de valores de pH más amplio.

4.3.3.3 Resultados obtenidos según el origen geográfico de procedencia del envasador de las muestras de miel

Estos resultados se han agrupado, en primer lugar en función de la comunidad autónoma de origen del envasador y se resumen en la Tabla 4.13.

Tabla 4.13 Valores de pH de las muestras analizadas agrupadas según la comunidad autónoma de procedencia del envasador.

Origen geográfico	n	pH
Castilla La Mancha	7	4,16 ± 0,33 (3,71 – 4,54)
Castilla y León	33	3,99 ± 0,29 (3,60 – 4,64)
Comunidad Valenciana	8	4,09 ± 0,34 (3,71 – 4,68)
Extremadura	2	3,99 ± 0,41 (3,70 – 4,28)
Galicia	75	4,13 ± 0,37 (3,59 – 5,44)

Promedio ± SD (V_{mín}-V_{máx})

Como se puede observar en esta tabla, los valores promedio de pH son similares en todas las comunidades autónomas. Se podría indicar que en las muestras Galicia se ha obtenido el rango más amplio de valores.

Las mieles de Galicia han sido clasificadas finalmente según la provincia de procedencia del envasador. Los resultados se muestran en la Figura 4.7.

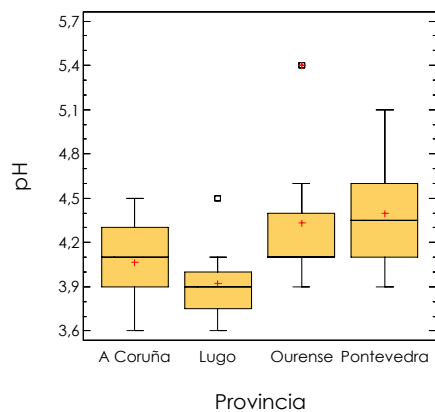


Figura 4.7. Valores de pH de las muestras gallegas analizadas agrupadas según el origen geográfico del envasador.

Los valores de pH más bajos se han determinado en mieles de Lugo. Por el contrario los valores de pH más elevados se encuentran en las mieles de Ourense y Pontevedra.

4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acquarone, C.; Buera, P.; Elizalde, B. Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*. **2007**, 101, 695-703.
- Adebisi, F. M.; Akpan, I.; Obiajunwa, E. I.; Olaniyi, H. B. Chemical/Physical characterization of Nigerian honey. *Pakistan Journal of Nutrition*. **2004**, 3(5), 278-281.
- Afik, O.; Dag, A.; Kerem, Z.; Shafir, S. Analyses of avocado (*Persea americana*) nectar properties and their perception by honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology*. **2006**, 32(9), 1949-1963.
- Ahmed, J.; Prabhu, S. T.; Raghavan, G. S. V.; Ngadi, M. Physico-chemical, rheological, calorimetric and dielectric behavior of selected Indian honey. *Journal of Food Engineering*. **2007**, 79(4), 1207-1213.
- Al-Khalifa, A. S.; Al-Arif, I. A. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Saudi honeys. *Food Chemistry*. **1999**, 67, 21-25.
- Al, M. L.; Daniel, D.; Moise, A.; Bobis, O.; Laslo, L.; Bogdanov, S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*. **2009**, 112(4), 863-867.
- Andrade, P. B.; Amaral, M. T.; P., I.; Carvalho, J. C. M. F.; Seabra, R. M.; Proença da Cunha, A. Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys. *Food Chemistry*. **1999**, 66, 503-510.
- Anupama, D.; Bhat, K. K.; Sapna, V. K. Sensory and physicochemical properties of commercial samples of honey. *Food Research International*. **2003**, 36, 183-191.

- Atrouse, O. M.; Oran, S. A.; Al-Abbadi, S. Y. Chemical analysis and identification of pollen grains from different Jordanian honey samples. *International Journal of Food Science and Technology*. **2004**, 39(4), 413–417.
- Azeredo, L. C.; Azeredo, M. A. A.; Souza, S. R.; Dutra, V. M. L. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*. **2003**, 80(2), 249-254.
- Barbier, E. C.; Valin, J. Détermination de la couleur des miels. *Annales des Falsifications et des Fraudes*. **1957**, 50(587/588), 400-411.
- Baroni, M. V.; Arrua, C.; Nores, M. L.; Fayé, P.; Díaz, M. P.; Chiabrando, G. A.; Wunderlin, D. A. Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. *Food Chemistry*. **2009**, 114(2), 727-733.
- Beretta, G.; Granata, P.; Ferrero, M.; Orioli, M.; Facino, R. M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*. **2005**, 533(2), 185-191.
- Bianchi, E. M. Determining the mineral (ash %) content in honey by conductometric analysis. *Apiacta*. **1992**, 27, 19-24.
- BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Orden de 17 de septiembre de 1981 por la que se establecen métodos oficiales de análisis de aceites y grasas, aguas, carnes y productos carnicos, fertilizantes, productos fitosanitarios, leche y productos lacteos, piensos y sus primeras materias, productos organicos fertilizantes, plantas, suelos, productos derivados de la uva y similares y toma de muestras. Madrid. España. **1981**.
- BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Orden del 12 de junio, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel. Madrid. España. **1986**.

- BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. Madrid. España. **2003**.
- Bogdanov, S.; Martin, P.; Lüllmann, C. Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*. **1997**, (extra issue), 1-59.
- Bogdanov, S.; Ruoff, K.; Persano Oddo, L. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: A review. *Apidologie*. **2004**, 35, S4-S17.
- Brice, B. A.; Turner, A.; White, J. W., Jr. Glass color standards for extracted honey. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*. **1956**, 39, 919-937.
- Bulut, L.; Kilic, M. Kinetics of hydroxymethylfurfural accumulation and color change in honey during storage in relation to moisture content. *Journal of Food Processing and Preservation*. **2009**, 33(1), 22-32.
- Carvalho, C. A. L.; Sodré, G. S.; Fonseca, A. A. O.; Alves, R. M. O.; Souza, B. A.; Clarton, L. Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (*Apidae: Meliponinae*) submitted to a dehumidification process. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. **2009**, 81(1), 143-149.
- Cavia, M. M.; Fernández-Muiño, M. A.; Gómez-Alonso, E.; Montes-Pérez, M. J.; Huidobro, J. F.; Sancho, M. T. Evolution of fructose and glucose in honey over one year: Influence of induced granulation. *Food Chemistry*. **2002**, 78, 157-161.
- Codex Alimentarius. (FAO/WHO). *Norma del Codex para la Miel. CODEX STAN 12-1981, Rev. 2*. **2001**.
- Conti, M. E.; Saccares, S.; Cubadda, F.; Cavallina, R.; Tenoglio, C. A.; Ciprotti, L. Il miele nel Lazio: Indagine sul contenuto in metalli in tracce e radionuclidi. *Rivista di Scienza dell'Alimentazione*. **1998**, 2, 107-119.
- Conti, M. E. Lazio region (central Italy) honeys: A survey of mineral content and typical quality parameters. *Food Control*. **2000**, 11, 459-463.

- Corbella, E.; Cozzolino, D. Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics. *LWT- Food Science and Technology*. **2006**, 39, 534-539.
- Cozzolino, D.; Corbella, E. Determination of honey quality components by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Apicultural Research*. **2003**, 42(1-2), 16-20.
- Crane, E. The traditional hive products: honey and beeswax. En *Bees and Beekeeping. Science, practice and world resources*, Heinemann Newnes: Oxford, U.K., **1990**, pp 388-451.
- Chelechovska, O.; Vorlová, L. Groups of honey-physicochemical properties and heavy metals. *Acta Veterinaria Brunensis*. **2001**, 70, 91-95.
- Dag, A.; Afik, O.; Yeselson, Y.; Schaffer, A.; Shafir, S. Physical, chemical and palynological characterization of avocado (*Persea americana* Mill.) honey in Israel. *International Journal of Food Science and Technology*. **2006**, 41(4), 387-394.
- Devillers, J.; Morlot, M.; Pham-Delegue, M. H.; Dore, J. C. Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry*. **2004**, 86(2), 305-312.
- Díez, M. J.; Andrés, C.; Terrab, A. Physicochemical parameters and pollen analysis of Moroccan honeydew honeys. *International Journal of Food Science and Technology*. **2004**, 39(2), 167-176.
- DOCE (DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS). Directiva 2001/110/CE del Consejo de 20 de diciembre de 2001, relativa a la miel. Bruselas. Bélgica. **2002**.
- Dos Santos, J. S.; Dos Santos, N. S.; Dos Santos, M. L. P.; Dos Santos, S. N.; Lacerda, J. J. D. J. Honey classification from semi-arid, atlantic and transitional

- forest zones in Bahia, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2008**, 19(3), 502-508.
- Downey, G.; Hussey, K.; Daniel Kelly, J.; Walshe, T. F.; Martin, P. G. Preliminary contribution to the characterisation of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. *Food Chemistry*. **2005**, 91(2), 347-354.
- Fallico, B.; Zappala, M.; Arena, E.; Verzera, A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*. **2004**, 85, 305-313.
- Frankel, S.; Robinson, G. E.; Berenbaum, M. R. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*. **1998**, 37(1), 27-31.
- Freitas, M. C.; Pacheco, A. M. G.; Ferreira, E. Nutrients and other elements in honey from Azores and mainland Portugal. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. **2006**, 270(1), 123-130.
- Gómez Bárez, J. A.; García-Villanova, R. J.; Elvira García, S.; Rivas Palá, T.; González Paramás, A. M.; Sánchez Sánchez, J. Geographical discrimination of honeys through the employment of sugar patterns and common chemical quality parameters. *European Food Research and Technology*. **2000**, 210, 437-444.
- Gonzales, A. P.; Burin, L.; Buera, M. D. P. Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International*. **1999**, 32(3), 185-191.
- González-Miret, M. L.; Terrab, A.; Hernanz, D.; Fernández-Recamales, M. A.; Heredia, F. J. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53(7), 2574-2580.
- González-Paramás, A. M.; Bárez, J. A. G.; García-Villanova, R. J.; Pala, T. R.; Albajar, R. A.; Sánchez, J. S. Geographical discrimination of honeys by using

- mineral composition and common chemical quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, 80(1), 157-165.
- 📖 González-Viñas, M. A.; Moya, A.; Cabezudo, M. D. Description of the sensory characteristics of Spanish unifloral honeys by free choice profiling. *Journal of Sensory Studies*. **2003**, 18(2), 103-113.
- 📖 Heredia, F. J.; Guzmán, M. Proposal of a novel formula to calculate dominant wavelength for colour of red wines. *Food Chemistry*. **1992**, 43, 125-128.
- 📖 Huidobro, J. F.; Simal, J. Determinación del color y la turbidez en las mieles. *Anales de Bromatología*. **1984a**, 36(2), 225-245.
- 📖 Huidobro, J. F.; Simal, J. Parámetros de calidad de la miel III: Acidez (pH, libre, láctónica y total) e índice de formol. *Offarm*. **1984b**, 3(9), 523-531.
- 📖 Joshi, S. R.; Pechhacker, H.; Willam, A.; Von der Ohe, W. Physico-chemical characteristics of *Apis dorsata*, *A. cerana* and *A. mellifera* honey from Chitwan district, central Nepal. *Apidologie*. **2000**, 31, 367-375.
- 📖 Khan, M. N.; Qaiser, M.; Raza, S. M.; Rehman, M. Physicochemical properties and pollen spectrum of imported and local samples of blossom honey from the Pakistani market. *International Journal of Food Science and Technology*. **2006**, 41(7), 775-781.
- 📖 Kottász, J. Gradding the colour of honey. *Méhészet*. **1958**, 6(6), 100.
- 📖 López, B.; Latorre, M. J.; Fernández, M. I.; García, M. A.; García, S.; Herrero, C. Chemometric classification of honeys according to their type based on quality control data. *Food Chemistry*. **1996**, 55(3), 281-287.
- 📖 Malacalza, N. H.; Caccavari, M. A.; Fagúndez, G.; Lupano, C. E. Unifloral honeys of the province of Buenos Aires, Argentine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2005**, 85, 1389-1396.

- ☞ Mateo, R.; Bosch-Reig, F. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars, and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1998**, 46(2), 393-400.
- ☞ Montes, C.; Campos, J.; Pons, A.; Heredia, F. J. Instrumental factors influencing absorption measurements for fluid food color determination. *Journal of AOAC International*. **2004**, 87(3), 632-638.
- ☞ Negueruela, A. I.; Pérez-Arquille, C. Color measurement of rosemary honey in the solid state by reflectance spectroscopy with black background. *Journal of AOAC International*. **2000**, 83(3), 669-674.
- ☞ Osman, K. A.; Al-Doghairi, M. A.; Al-Rehiayani, S.; Helal, M. I. D. Mineral contents and physicochemical properties of natural honey produced in Al-Qassim region, Saudi Arabia. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. **2007**, 5(3-4), 142-146.
- ☞ Ouchemoukh, S.; Louaileche, H.; Schweitzer, P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Control*. **2007**, 18, 52-58.
- ☞ Peña Crecente, R.; Herrero Latorre, C. Pattern recognition analysis applied to classification of honeys from two geographic origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1993**, 41(4), 560-564.
- ☞ Pérez-Arquillué, C.; Conchello, P.; Ariño, A.; Teresa, J.; Herrera, A. Quality evaluation of Spanish rosemary (*Rosmarinus officinalis*) honey. *Food Chemistry*. **1994**, 51, 207-210.
- ☞ Pérez-Arquillué, C.; Conchello, P.; Ariño, A.; Teresa, J.; Herrera, A. Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. *Food Chemistry*. **1995**, 54, 167-172.
- ☞ Persano Oddo, L.; Piro, R. Main european unifloral honeys: Descriptive sheets. *Apidologie*. **2004**, 35, S38-S81.

- 📖 Popek, S. A procedure to identify a honey type. *Food Chemistry*. **2002**, 79, 401-406.
- 📖 Popek, S. Application of regression analysis as a method to determine total ash content in some selected nectar honeys. *Nahrung-Food*. **2003a**, 47(1), 36-38.
- 📖 Popek, S. Identification of honey types. *Nahrung-Food*. **2003b**, 47(1), 39-40.
- 📖 Przybylowski, P.; Wilczynska, A. Honey as an environmental marker. *Food Chemistry*. **2001**, 74(3), 289-291.
- 📖 Real Academia Española. <<http://www.rae.es/rae.html>> [consulta: 7 agosto 2008].
- 📖 Ruoff, K.; Luginbuhl, W.; Bogdanov, S.; Bosset, J. O.; Estermann, B.; Ziolk, T.; Kheradmandan, S.; Amado, R. Quantitative determination of physical and chemical measurands in honey by near-infrared spectrometry. *European Food Research and Technology*. **2007**, 225, 415-423.
- 📖 Sahinler, N.; Sahinler, S.; Gul, A. Biochemical composition of honeys produced in Turkey. *Journal of Apicultural Research*. **2004**, 43(2), 53-56.
- 📖 San Juan, E.; Estupiñán, R.; Millán, M.; Castelo, M.; Penedo, J. C.; Cardona, A. Contribution to the quality evaluation and the water activity prediction of La Palma Island honey. *Journal of Food Quality*. **1997**, 20, 225-234.
- 📖 Sancho, M. T.; Muniategui, S.; Sánchez, M. P.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J. Relationships between electrical conductivity and total and sulphated ash contents in basque honeys. *Apidologie*. **1991a**, 22, 487-494.
- 📖 Sancho, M. T.; Muniategui, S.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J. Correlation between the electrical conductivity of honey in humid and dry matter. *Apidologie*. **1991b**, 22, 221-227.
- 📖 Sancho, M. T.; Muniategui, S.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J. Mielles del País Vasco. I: pH y tipos de acidez. *Anales de Bromatología*. **1991c**, 53(1), 77-86.

- Sanz, S.; Pérez, C.; Herrera, A.; Sanz, M.; Juan, T. Composición de las mieles de la Rioja. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. **1994**, 34(5), 540-552.
- Saric, G.; Matkovic, D.; Hruskar, M.; Vahcic, N. Characterisation and classification of Croatian honey by physicochemical parameters. *Food Technology and Biotechnology*. **2008**, 46(4), 355-367.
- Sechrist, E. L. The colour grading of honey. *Circular of U.S. Department of Agriculture*. **1925**, 364, 1-7.
- Serra Bonvehí, J.; Bentabol Manzanares, A.; Santos Vilar, J. M. Quality evaluation of broom honey (*Spartocytisus supranubius* L) produced in Tenerife (The Canary Islands). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2004**, 84, 1097-1104.
- Serrano, S.; Villarejo, M.; Espejo, R.; Jodral, M. Chemical and physical parameters of Andalusian honey: Classification of *Citrus* and *Eucalyptus* honeys by discriminant analysis. *Food Chemistry*. **2004**, 87(4), 619-625.
- Sodré, G. S.; Marchini, L. C.; Carmelo Moreti, A. C. C.; Pozar Otsuk, I.; Lopes de Carvalho, C. A. Physical-chemical characterization of honey samples of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) from Ceará State. *Ciência Rural*. **2007**, 37(4), 1139-1144.
- Soria, A. C.; González, M.; De Lorenzo, C.; Martínez-Castroa, I.; Sanza, J. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chemistry*. **2004**, 85(1), 121-130.
- Souza, B. A.; Roubik, D.; Barth, O.; Heard, T.; Enríquez, E.; Carvalho, C. A. L.; Villas-Boas, J.; Marchini, L. C.; Locatelli, J.; Persano Oddo, L.; Almeida-Muradian, L.; Bogdanov, S.; Vit, P. Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. *Interciencia*. **2006**, 31(12), 867-875.

- Spano, N.; Ciulu, M.; Floris, I.; Panzanelli, A.; Pito, M. I.; Piu, P. C.; Scanu, R.; Sanna, G. Chemical characterization of a traditional honey-based Sardinian product: Abbamele. *Food Chemistry*. **2008**, 108, 81-85.
- Terrab, A.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Chromatic characterisation of Moroccan honeys by diffuse reflectance and tristimulus colorimetry - Non-uniform and uniform colour spaces. *Food Science and Technology International*. **2002**, 8(4), 189-195.
- Terrab, A.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: I. River red gum (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) honey. *International Journal of Food Science and Technology*. **2003a**, 38(4), 379-386.
- Terrab, A.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: II. Orange (*Citrus* sp.) honey. *International Journal of Food Science and Technology*. **2003b**, 38(4), 387-394.
- Terrab, A.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: III. Other unifloral honey types. *International Journal of Food Science and Technology*. **2003c**, 38(4), 395-402.
- Terrab, A.; González, A. G.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. *European Food Research and Technology*. **2003d**, 218(1), 88-95.
- Terrab, A.; González, A. G.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution to the characterisation of unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2003e**, 83(7), 637-643.
- Terrab, A.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J. Colour characterisation of thyme and avocado honeys by diffuse reflectance spectrophotometry and spectroradiometry. *European Food Research and Technology*. **2004a**, 218, 488-492.

- 📖 Terrab, A.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J. Colour characterisation of thyme and avocado honeys by diffuse reflectance spectrophotometry and spectroradiometry. *European Food Research and Technology*. **2004b**, 218, 488-492.
- 📖 Terrab, A.; Heredia, F. J. Characterisation of avocado (*Persea americana* Mill) honeys by their physicochemical characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2004**, 84(13), 1801-1805.
- 📖 Turhan, K. Chemical contents and some trace metals of honeys produced in the Middle Anatolia region of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*. **2007**, 16(5), 459-464.
- 📖 Turkmen, N.; Sari, F.; Poyrazoglu, E. S.; Sedat Velioglu, Y. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*. **2006**, 95(4), 653-657.
- 📖 Vela, L.; Lorenzo, C.; Pérez, R. A. Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2007**, 87, 1069-1075.
- 📖 Vorwohl, G. Die Beziehungen zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtmässigen Herkunft. *Annls Abeille*. **1964**, 7(4), 301-309.
- 📖 Welke, J. E.; Reginatto, S.; Ferreira, D.; Vicenzi, R.; Soares, J. M. Physicochemical characterization of *Apis mellifera* L. honeys from the northwest region of Rio Grande do Sul State. *Ciência Rural*. **2008**, 38(6), 1737-1741.
- 💻 Westland, S. Qué es el espacio de color CIE 1931. <http://www.gusgsm.com/espacio_color_cie_1931> [consulta: 27 febrero 2009].
- 📖 White, J. W., Jr. Determination of acidity, nitrogen and ash in honey. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1962**, 45(3), 548-551.

- Yilmaz, H.; Yavuz, O. Content of some trace metals in honey from south-eastern Anatolia. *Food Chemistry*. **1999**, 65, 475-476.



CAPÍTULO 5

Minerales



5.1 ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar (CE) se basa en la separación de los componentes de una muestra a través de un capilar por la acción de un campo eléctrico (Cruces, 1998).

La gran ventaja de la electroforesis capilar (CE) frente a otras técnicas ampliamente difundidas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es que esta técnica permite separar componentes de muy distinta naturaleza con el mismo capilar cambiando únicamente el medio electroforético. Además, se trata de una técnica que proporciona gran resolución, tiempos de análisis cortos y ausencia o simple preparación de la muestra (Timerbaev, 2004). Estos dos últimos aspectos conllevan a que se trate de una técnica muy ventajosa desde el punto de vista económico.

5.1.1 Instrumentación

Se compone de una instrumentación sencilla (Fig. 5.1) que básicamente consiste en (Gordon et al., 1988; Heiger, 1992; Li, 1992; Cruces, 1998):

- a) **Fuente de alimentación de alto voltaje**, cuya función es producir el voltaje, corriente o potencia necesaria para llevar a cabo la separación electroforética. El rango usual es entre 5 y 30 kV. La fuerza iónica de la disolución tampón se suele seleccionar durante el desarrollo del método, para que la aplicación de estos voltajes genere corrientes comprendidas entre 10 y 100 μA .
- b) **Dos reservorios de electrolito**.
- c) **Capilar**, consistente en un tubo de sílice fundida cuyo diámetro y longitud oscilan entre 10-200 μm y 10-200 cm, respectivamente. Está recubierto de una capa de poliimida, que evita su rotura durante la manipulación. Esta capa debe eliminarse en la zona de detección.
- d) **Sistema de inyección de muestra**. Existen dos tipos: hidrodinámica y electrocinética. La inyección hidrodinámica se basa en la introducción

de muestra en un extremo del capilar debido a la existencia de una diferencia de presión entre el capilar y el recipiente donde se encuentra la muestra. Se puede realizar de tres maneras diferentes: por *presión*, aplicando presión al recipiente que contiene la muestra; por *succión*, que consiste en aplicar vacío al reservorio de destino donde se encuentra un extremo del capilar y se coloca el otro extremo en el recipiente que contiene la muestra y, por *gravedad*, en el que se coloca el extremo del capilar en el recipiente que contiene la muestra y éste se eleva por encima del reservorio de destino durante unos segundos. La inyección electrocinética, también conocida como inyección por electromigración, consiste en colocar el capilar y el electrodo dentro del recipiente que contiene la muestra y aplicar un pequeño voltaje (1-5 kV) durante un corto período de tiempo (1-10 segundos) haciendo migrar los componentes de la muestra dentro del capilar.

- e) **Detector** que dependerá de las propiedades del soluto a analizar. Existen diferentes formas de detección como índice de refracción, fluorescencia, espectrometría de masas, etc. Una de las más utilizadas es la absorción ultravioleta en la que la lectura puede ser *directa* (el electrolito transparente a la luz ultravioleta y los analitos la absorben) o *indirecta* (el electrolito absorbe y los analitos son transparentes).
- f) **Sistema de adquisición de datos** que permite adquirir y visualizar los picos en un electroferograma, en función del tiempo de migración.

Este esquema puede ser completado con otros elementos como inyector de muestras automático, control de la temperatura tanto del capilar como de la muestra, fuente de alimentación programable, diferentes detectores, colector de fracciones y un sistema de adquisición de datos computerizado.

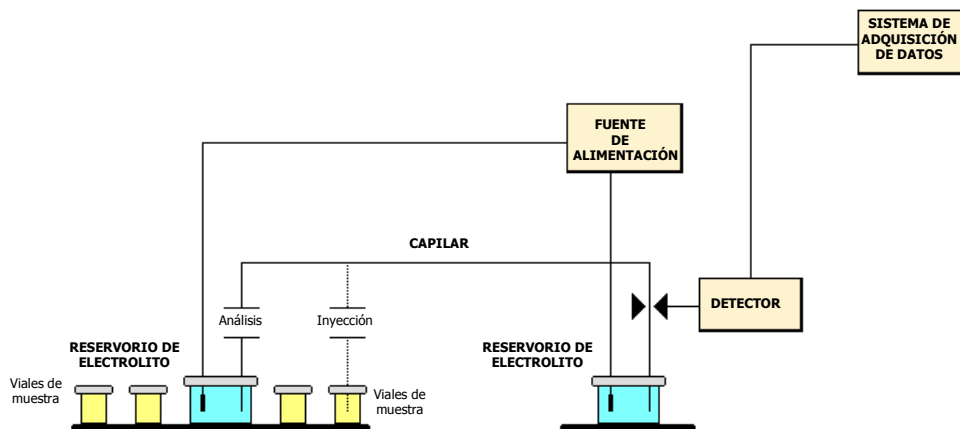


Figura 5.1 Representación esquemática de la instrumentación básica de la electroforesis capilar. *Basada en la de Thibault y Dovichi (1998).*

5.1.2 Tipos de separación

Se han desarrollado diferentes modos de separación de la electroforesis capilar para resolver los distintos problemas analíticos que se puedan presentar. El origen de estos modos de separación se puede atribuir al hecho de que la electroforesis capilar se ha desarrollado como una combinación de técnicas electroforéticas y cromatográficas. Estos modos de separación se pueden clasificar en (Camilleri, 1998; Cruces, 1998):

- **Electroforesis capilar en zona (CZE).** La separación se basa en la diferente movilidad electroforética que presentan las sustancias iónicas (aniones y cationes) en el electrolito que se encuentra relleno el interior del capilar. Se trata del modo más empleado de electroforesis capilar debido a su simplicidad y versatilidad. Sin embargo, este modo presenta la limitación de que no permite la separación de sustancias neutras.
- **Cromatografía capilar electrocinética micelar (MECC o MEKC).** El mecanismo de separación se basa en el reparto de los solutos entre una fase micelar y una fase acuosa. Es un híbrido entre la cromatografía y la electroforesis. En esta técnica se añaden sustancias tensioactivas al electrolito que, a una determinada concentración, forman micelas. Es el único modo de electroforesis capilar que permite la separación tanto de especies cargadas como de neutras.

- **Electroforesis capilar en gel (CGE).** La separación tiene lugar al desplazarse los solutos a través de los poros de un polímero que rellena el capilar y que actúa como un tamiz molecular. Se utiliza fundamentalmente para la separación de macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos.
- **Electrocromatografía capilar (CEC).** La separación se basa en procesos electroforéticos e interacciones con la fase estacionaria. El capilar está relleno con un material habitual en cromatografía líquida como es la sílica gel y se diferencia de esta técnica en que se sustituye una bomba de alta presión por una fuente de alto voltaje.
- **Isoelectroenfoque capilar (CIEF).** La separación se basa en la migración electroforética de sustancias anfóteras en un gradiente de pH creado por un anfótero. Estas sustancias se van a separar en función de sus diferentes puntos isoeléctricos y no por sus diferentes movilidades electroforéticas. Se utiliza fundamentalmente para la separación de péptidos y proteínas.
- **Isotacoforesis capilar (CITP).** Se basa en que las bandas de muestra se desplazan a la misma velocidad en el interior del capilar entre dos soluciones tampón denominadas electrolito frontal y terminal que tienen diferente conductividad eléctrica. Es una forma de operar muy diferente a las anteriores porque utiliza un sistema de tampón discontinuo. Se separan sustancias iónicas aunque en un mismo análisis no es posible separar aniones y cationes.

En este trabajo, para la determinación de los cationes y los aniones en muestras de miel se han empleado métodos de electroforesis capilar en zona (CZE) con detección UV indirecta.

5.1.3 Electroforesis Capilar en Zona (CZE)

Como se ha comentado anteriormente, el fundamento de la electroforesis capilar en zona consiste en la separación de las sustancias iónicas (aniones y cationes) por su diferente migración o movilidad electroforética al aplicar un campo eléctrico en el interior de un capilar de sílice fundida relleno de electrolito (Gordon *et al.*, 1988; Heiger, 1992; Li, 1992; Cruces, 1998).

Esta diferente migración de las especies en el interior de un capilar se rige por dos fenómenos que tienen lugar simultáneamente: electromigración y electroósmosis.

Electromigración

Se entiende por electromigración, el fenómeno de transporte según el cual los analitos son arrastrados por la acción de un campo eléctrico y de la corriente eléctrica concomitante.

La *velocidad electroforética* (v_e), que viene definida por la expresión (1), es aquella a la que se mueve una sustancia a través de una disolución tampón bajo la influencia de un campo eléctrico y en ausencia del fenómeno de electroósmosis. La *movilidad electroforética* (μ_e) de una sustancia iónica viene dada por la expresión (2) y se puede observar que depende de su relación carga/tamaño (q/r) de forma que, para unas mismas condiciones operacionales, cuanto mayor sea esta relación mayor será la movilidad electroforética de una sustancia.

$$\begin{aligned} (1) \quad v_e &= \mu_e E = \mu_e \frac{V}{L_T} \\ (2) \quad \mu_e &= \frac{q}{6\pi\eta r} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} (1) \quad v_e &= \mu_e E = \mu_e \frac{V}{L_T} \\ (2) \quad \mu_e &= \frac{q}{6\pi\eta r} \end{aligned}} \right\} \begin{aligned} E &= \text{campo eléctrico aplicado.} \\ V &= \text{voltaje aplicado.} \\ L_T &= \text{longitud total del capilar.} \\ q &= \text{carga del ión.} \\ \eta &= \text{viscosidad del electrolito.} \\ r &= \text{radio del ión.} \end{aligned}$$

Electroósmosis

Este fenómeno se define como el movimiento relativo de un líquido con respecto a una superficie cargada bajo la acción de un campo eléctrico. En condiciones normales de trabajo este flujo denominado *flujo electroosmótico* (EOF) se desplaza hacia el cátodo, independientemente de la polaridad de la fuente de alimentación (Fig. 5.2).

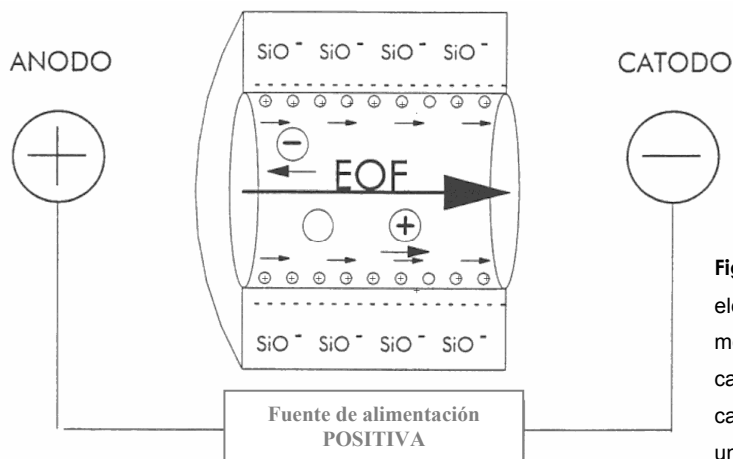


Figura 5.2 Movimiento del flujo electroosmótico (EOF) y movilidad de aniones y cationes en el interior de un capilar de sílice fundida con una fuente de alimentación (Waters, 1995).

Los capilares de sílice fundida presentan en su superficie grupos silanoles (Si-OH) que se van a ionizar dependiendo del pH de la disolución del electrolito. Se ha comprobado que la ionización es prácticamente nula a pH 2,5, sin embargo a $\text{pH} > 3,0$, los grupos silanoles libres de la superficie de la sílice se ionizan (Si-O^-) dejando la pared del capilar cargada negativamente. Estas cargas negativas atraen a los cationes de la disolución tampón formándose una capa inerte de cargas positivas en la pared del capilar que se denomina *capa fija*. Como estos cationes no tienen la suficiente densidad para compensar todas las cargas negativas de la pared, se coloca otra capa de cationes que se encuentra más débilmente unida y que constituye la llamada *capa móvil*. Ambas capas forman la *doble capa difusa* de cationes entre las que se crea una diferencia de potencial denominada potencial zeta (ζ). Cuando se aplica un campo eléctrico, la capa móvil de cationes migra hacia el cátodo y arrastra todo el fluido del interior del capilar dando lugar al flujo electroosmótico.

Para la determinación de cationes, se trabajará con una fuente de alimentación positiva, de modo que el cátodo esté en el extremo de detección. Los cationes migran hacia el cátodo por movilidad propia mientras que los compuestos neutros y los aniones lentos son arrastrados por el flujo electroosmótico. Sin embargo, los aniones con una movilidad superior a la del flujo electroosmótico migrarán hacia el ánodo y no serán detectados.

Para el análisis de aniones es necesario, por una parte, utilizar una fuente de alimentación negativa (ánodo en el extremo de detección) y, por otra, invertir o suprimir el flujo electroosmótico con el fin de que al aplicar el campo eléctrico, todos los aniones migren hacia el ánodo (detector).

Al igual que se definía la velocidad electroforética también se puede definir una *velocidad de flujo electroosmótico* (v_{EOF}) que se calcula mediante la expresión (3). Esta velocidad es proporcional a la movilidad debida al flujo electroosmótico (μ_{EOF}) que viene dada por la expresión (4).

$$\begin{aligned} (3) \quad v_{EOF} &= \mu_{EOF} E = \mu_{EOF} \frac{V}{L_T} \\ (4) \quad \mu_{EOF} &= \frac{\zeta \varepsilon}{4\pi\eta} \end{aligned} \quad \left. \begin{array}{l} E = \text{campo eléctrico aplicado.} \\ V = \text{voltaje aplicado.} \\ L_T = \text{longitud total del capilar.} \\ \zeta = \text{potencial zeta.} \\ \varepsilon = \text{constante dieléctrica del} \\ \text{electrolito.} \\ \eta = \text{viscosidad del electrolito.} \end{array} \right\}$$

Los fenómenos de electromigración y electroósmosis se dan simultáneamente en el interior del capilar. La velocidad de una especie en una muestra va a depender de ambos fenómenos por lo que la *velocidad electroforética efectiva o real* (v_r) de un componente vendrá dada por la expresión (5).

$$(5) \quad v_r = v_e + v_{EOF} = (\mu_e + \mu_{EOF}) \frac{V}{L_T}$$

El tiempo de migración efectivo o real (t_m) es el tiempo que tarda el soluto en moverse desde el principio del capilar hasta la ventana del detector y vendrá dado por la expresión (6).

$$(6) \quad t_m = \frac{L_T}{v_r} = \frac{L_T^2}{(\mu_e + \mu_{EOF}) V}$$

5.1.4 Electroforesis capilar aplicada a la miel

Además del análisis de minerales, la electroforesis capilar ha sido utilizada para la determinación de diferentes componentes de la miel como ácidos orgánicos (*Navarrete et al., 2005; Mato et al., 2006; Ji et al., 2007*), azúcares (*Basa et al., 2007*), fenoles (*Andrade et al., 1997; Arráez-Román et al., 2006; Gómez-Caravaca et al., 2006a; Gómez-Caravaca et al., 2006b*), flavonoides (*Delgado et al., 1994*) y residuos de antibióticos (*Chen et al., 2001; Casado-Terrones et al., 2007; Ma et al., 2007*).



5.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Con el objetivo de que la búsqueda bibliográfica tenga reproducibilidad, se ha realizado una revisión sistemática de la literatura científica cuyas características se resumen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Características de la búsqueda sistemática realizada en relación con los métodos de determinación de los minerales en la miel.

Período de búsqueda	Hasta el 9 enero de 2009	
Base de datos	MEDLINE, SCIFINDER SCHOLAR y SCOPUS	
Estrategia de búsqueda	Anions and honey / cations and honey / minerals and honey (en título, resumen o palabras clave)	
Herramienta de selección de estudios	Lectura del resumen	
CRITERIOS DE SELECCIÓN	Inclusión	Exclusión
1. Tipo de estudio	Métodos de determinación de los minerales objeto de este trabajo Muestras de miel Miel como alimento	Métodos de determinación de otros parámetros Patentes Los estudios que no se refieren a la miel como alimento
2. Idioma	Estudios en español, inglés, francés, italiano y portugués	Estudios en otros idiomas
3. Accesibilidad	Disponibles	No disponibles
RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA		
ARTÍCULOS ENCONTRADOS	628	
ARTÍCULOS EXCLUIDOS	579	
ARTÍCULOS LEÍDOS A TEXTO COMPLETO	58	
ARTÍCULOS INCLUIDOS EN LA REVISIÓN	55	
Artículos incluidos en la revisión a partir de la lectura de los anteriores	23	
Artículos eliminados después de la lectura completa de los mismos:		
Referencia	Motivos de exclusión	
Popek (2003a)	Se determinan cenizas totales pero no minerales	
Popek (2003b)	Se determinan cenizas totales pero no minerales	
Arvanitoyannis et al. (2005)	Artículo de revisión de componentes de la miel que son capaces de discriminar el origen geográfico y botánico de las mismas en el que no se aportan novedades que no se encuentren en el resto de la bibliografía consultada	

Los minerales se encuentran en forma minoritaria en la miel por lo que su determinación se hace difícil al ser necesario eliminar los azúcares, compuestos

que interfieren en el análisis. Por este motivo, se han desarrollado numerosos métodos para identificar y cuantificar los minerales en las muestras de miel.

5.2.1 Métodos gravimétricos, volumétricos, colorimétricos y turbidimétricos

Ehrhardt y Liebig (1965) analizaron cloruro y fosfato mediante gravimetrías y volumetrías complexométricas después de la desecación de las muestras de miel. Los cloruros también han sido determinados mediante una volumetría mercurimétrica (*Rodríguez-Otero et al., 1995*) o con una solución de nitrato de plata (*González-Paramás et al., 2000*). El fosfato se ha determinado mediante una colorimetría con el reactivo molibdato-vanadato (*Abu-Tarboush et al., 1993; Rodríguez-Otero et al., 1995; González-Paramás et al., 2000; De Ferrer et al., 2004*). *Rodríguez-Otero et al. (1995)* y *González-Paramás et al. (2000)* determinaron sulfato mediante turbidimetría con sulfato de bario.

El calcio y el magnesio se han determinado mediante volumetrías (*Rodríguez-Otero et al., 1992; González-Paramás et al., 2000*) mientras que el hierro y manganeso fueron determinados con colorimetrías (*Rodríguez-Otero et al., 1992*).

Por su parte, el potasio de las muestras de miel se ha analizado mediante precipitación del mismo con tetrafenilborato sódico, separación en una columna de intercambio iónico y volumetría final ácido-base (*Azeredo et al., 1998*).

5.2.2 Métodos espectroscópicos

Son los más utilizados en la determinación de minerales en muestras de miel. La mayor parte de estos métodos necesita un largo y tedioso tratamiento de mineralización de la muestra antes del análisis espectroscópico. Este tratamiento de la muestra es el mayor inconveniente de los métodos espectroscópicos ya que requieren mucho tiempo (normalmente, un día de preparación) e incluyen etapas que pueden ser potenciales fuentes de pérdida de analito o de contaminación del mismo, lo que puede llevar a una cuantificación errónea del contenido mineral de las mieles.

Para la mineralización de la muestra se ha utilizado, fundamentalmente, la calcinación o la digestión ácida con el fin de desestabilizar los compuestos orgánicos y liberar los minerales hacia una solución acuosa adecuada para su

introducción en atomizadores (llama u horno de grafito) o en fuentes de excitación, como ocurre en la espectroscopía por plasma de acoplamiento inductivo (Pohl, 2009).

En el caso de la *calcinación*, los métodos descritos utilizan cantidades de muestra de 5 g (Terrab et al., 2003a, b, c; Terrab et al., 2003d; Díez et al., 2004; Terrab y Heredia, 2004; Terrab et al., 2004a; Downey et al., 2005; Osman et al., 2007) o de 20 g (Abu-Tarboush et al., 1993; Latorre et al., 1999; Yilmaz y Yavuz, 1999). En este proceso, las muestras de miel se incineran a 550-600°C hasta masa constante. A continuación, las cenizas se disuelven en soluciones de ácido clorhídrico, ácido nítrico o una mezcla de ambos y se calientan hasta obtener la completa sequedad de las mismas. Por último, el residuo seco se disuelve en la misma solución ácida y se enrasa con agua hasta un volumen determinado que dependerá de la dilución final de la muestra que se pretenda obtener (Pohl, 2009).

Con respecto a la *digestión ácida*, las muestras se incineran con la ayuda de reactivos oxidantes como ácido nítrico, peróxido de hidrógeno, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o una mezcla de dos de los anteriores. En este tratamiento, las cantidades de muestra utilizadas oscilan entre 1 y 5 g (Nanda et al., 2003; Devillers et al., 2004; Kucuk et al., 2007; Osman et al., 2007), llevándose a cabo calentamientos suaves iniciales para evitar la formación de espuma y aumentando posteriormente el calentamiento a 100°C, temperatura a la que se mantiene durante 24 horas, aproximadamente.

También se han desarrollado métodos en los que se lleva a cabo el análisis de las muestras sin un tratamiento previo minimizando el riesgo de contaminación o de pérdida de analitos durante el proceso de mineralización de la muestra. En este caso, las muestras se suelen diluir en agua (Matei et al., 2004; Ioannidou et al., 2005) o en soluciones ácidas que se someten a filtración (Poiana et al., 1996; López-García et al., 1999; Nozal Nalda et al., 2005). En otras ocasiones, las muestras son sometidas a sonicación (Radovic et al., 2001; Mendes et al., 2006) o fuerte agitación (López-García et al., 1999).

Yazgan et al. (2006) comparan el análisis directo de las muestras con el tratamiento mediante calcinación pero no indican cuales son las conclusiones de esta comparación.

5.2.2.1 Espectroscopía de absorción atómica (AAS)

Se trata de un método analítico basado en la absorción de radiación por los átomos libres en estado gaseoso. Comúnmente, en la espectroscopía de absorción atómica se utilizan dos tipos de atomización (*Miller y Rutzke, 2003*): la atomización de llama y la atomización electrotérmica en cámara de grafito, dando lugar a dos tipos de espectroscopía que son la espectroscopía de absorción atómica de llama (F-AAS) y la espectroscopía de absorción atómica electrotérmica (ET-AAS).

En la espectroscopía de absorción atómica de llama (F-AAS) se hace uso de un sistema nebulizador-quemador para transformar una disolución de la muestra en un vapor de átomos. La espectroscopía de absorción atómica electrotérmica (ET-AAS) requiere el calentamiento de la muestra en una cámara de grafito hasta una temperatura de 2000-3000°C que provoca la volatilización y la atomización (*Miller y Rutzke, 2003*).

Existen numerosas referencias que utilizan esta técnica para la determinación de minerales en las muestras de miel. Los aspectos principales de las mismas se resumen en la Tabla 5.2.

De los trabajos resumidos en esta tabla merecen un comentario adicional los que se indican a continuación:

Pohl y Prusisz (2006) desarrollan un método para la determinación de calcio y magnesio en varias matrices entre las que se incluye la miel. Es el único trabajo que, como tratamiento previo de la muestra, propone una extracción en fase sólida con resinas de intercambio iónico seguida de una digestión con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno.

La espectroscopía de absorción atómica electrotérmica (ET-AAS) ha sido utilizada por *Rodríguez García et al. (2006)* para la determinación de diversos minerales en muestras gallegas procedentes de zonas rurales, urbanas e industriales con el objetivo de investigar si el contenido mineral de la miel puede ser buen indicador de contaminación ambiental. Concluyen, en su estudio, que el perfil mineral de la miel parece proporcionar suficiente información como para clasificar a las muestras de acuerdo a su ambiente circundante. Así, la miel podría ser un potencial indicador de zonas contaminadas en Galicia.

Tabla 5.2 (continúa)

Métodos de determinación de minerales en miel mediante espectroscopía de absorción atómica.

Autores	Minerales determinados	n	Preparación de la muestra	Método
Abu-Tarboush et al. (1993)	Calcio, hierro, potasio y sodio	6	Digestión ácida	F-AAS
Rodríguez-Otero et al. (1994)	Cobre	91	Calcinación	F-AAS
Uren et al. (1998)	Cadmio, calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, plomo y zinc	74	Calcinación	F-AAS
López-García et al. (1999)	Calcio, magnesio y zinc	4	Disolución en clorhídrico y sal de lantano	F-AAS
Yilmaz y Yavuz (1999)	Cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, níquel y zinc	30	Calcinación	F-AAS
Conti (2000)	Calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, sodio y zinc	84	Digestión ácida asistida por microondas	F-AAS
González-Paramás et al. (2000)	Manganeso y níquel	60	NI	ET-AAS
Nanda et al. (2003)	Calcio, cobre, hierro, potasio, sodio y zinc	210	Digestión ácida	F-AAS
De Ferrer et al. (2004)	Calcio, cobre, hierro, magnesio y manganeso	30	Calcinación	F-AAS
Rashed y Soltan (2004)	Cadmio, cobalto, cobre, estroncio, hierro, magnesio, manganeso, níquel, plomo, potasio y sodio	10	Digestión ácida	F-AAS
Downey et al. (2005)	Calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, sodio y zinc	50	Calcinación	F-AAS
Erbilir y Erdogrul (2005)	Cadmio, cobre, hierro, magnesio, manganeso y níquel	21	Calcinación	F-AAS
Hernández et al. (2005)	Calcio, cobre, estroncio, hierro, magnesio y zinc	116	Calcinación	F-AAS
Khan et al. (2006)	Bismuto, cadmio, cobalto, cobre, hierro, litio, manganeso, níquel, potasio y sodio,	15	NI	F-AAS
Pohl y Prusisz (2006)	Calcio y magnesio	6	Extracción en fase sólida con resinas de intercambio iónico y digestión ácida	F-AAS
Rodríguez García et al. (2006)	Cadmio, calcio, cobre, cromo, hierro, litio, magnesio, manganeso, níquel, plomo, potasio, sodio y zinc	40	Calcinación	ET-AAS
Ajtony et al. (2007)	Arsénico, cadmio, cobre, cromo y plomo	42	Análisis directo / digestión asistida por microondas	ET-AAS
Conti et al. (2007)	Calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio y sodio	69	Calcinación	F-AAS
Kucuk et al. (2007)	Calcio, cobre, hierro, manganeso, potasio, sodio y zinc	3	Digestión ácida	F-AAS
Osman et al. (2007)	Cadmio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, plomo y zinc	NI	Digestión ácida	F-AAS
Turhan (2007)	Calcio, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, sodio y zinc	40	Calcinación	F-AAS

Tabla 5.2 (continuación)

Métodos de determinación de minerales en miel mediante espectroscopía de absorción atómica.

Autores	Minerales determinados	n	Preparación de la muestra	Método
<i>Tuzen et al. (2007)</i>	Hierro y zinc	25	Calcinación / digestión ácida / digestión asistida por microondas	F-AAS
	Aluminio, cadmio, cobre, cromo, manganeso, níquel, plomo y selenio			ET-AAS
<i>Yarsan et al. (2007)</i>	Aluminio, cobalto, cobre, cromo, hierro, manganeso, níquel y zinc	45	Calcinación	ET-AAS
<i>Dos Santos et al. (2008)</i>	Calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, sodio y zinc	52	Calcinación / extracción con ultrasonidos	F-AAS
<i>Madejczyk y Baralkiewicz (2008)</i>	Calcio, cobre, hierro, magnesio, potasio, sodio y zinc	30	Digestión asistida por microondas	F-AAS
<i>Omode y Ademukola (2008)</i>	Calcio, cobre, hierro, níquel, plomo, titanio y zinc	5	Digestión ácida	ET-AAS
<i>Silici et al. (2008)</i>	Calcio, hierro, magnesio, manganeso, potasio y zinc	20	Digestión ácida asistida por microondas	F-AAS
	Aluminio, cadmio, cobalto, cobre, cromo, níquel, plomo y selenio			ET-AAS
<i>Stankovska et al. (2008)</i>	Cadmio, cobre, hierro y manganeso	123	Digestión ácida asistida por microondas	ET-AAS
	Calcio, magnesio, potasio, sodio y zinc			F-AAS
<i>Baroni et al. (2009)</i>	Calcio, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, níquel, potasio, sodio y zinc	75	Calcinación	F-AAS
<i>Juszczak et al. (2009)</i>	Calcio, cobre, hierro, magnesio, potasio, sodio y zinc	10	Digestión ácida	F-AAS

ET-AAS: Espectroscopía de absorción atómica electrotérmica
 F-AAS: Espectroscopía de absorción atómica de llama
 NI: No indicado en el trabajo publicado

Ajtony et al. (2007) utilizan la espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito multi-elementos como atomizador (ET-AAS). Estudian el efecto de varios modificadores para mejorar la pirólisis y la atomización. Además, ensayan dos procedimientos de preparación de la muestra, el análisis directo y la digestión asistida por microondas.

Tuzen et al. (2007) determinan los minerales en mieles turcas mediante las técnicas F-AAS o ET-AAS después de una calcinación, digestión ácida y digestión asistida por microondas de las muestras. Concluyen, en primer lugar, que con la digestión asistida por microondas como tratamiento previo de las muestras se obtienen los valores más elevados en términos de recuperación, por lo que seleccionan este tratamiento como el más adecuado. En segundo lugar, teniendo en cuenta el contenido en minerales de las mieles analizadas,

concluyen que este contenido mineral está correlacionado con la contaminación de la región de la que procede la muestra.

5.2.2.2 Espectroscopía de emisión atómica (AES)

A diferencia de la espectroscopía de absorción atómica (AAS), en la espectroscopía de emisión atómica (AES) la fuente de radiación la constituyen los átomos o los iones excitados presentes en la muestra, en lugar de una fuente externa. Las dos formas más comunes de la espectroscopía de emisión atómica (AES) utilizadas en el análisis de alimentos son la espectroscopía de emisión atómica de llama y la espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) (Miller y Rutzke, 2003).

5.2.2.2.1 Espectroscopía de emisión atómica de llama (F-AES)

Los minerales que se determinan con mayor frecuencia mediante esta técnica son los cationes potasio y sodio.

La espectroscopía de emisión de llama hace uso de un sistema nebulizador-quemador para atomizar y excitar la muestra.

El instrumento de detección puede ser un fotómetro (que utiliza un filtro para separar las líneas de emisión) o bien un espectrofotómetro (Miller y Rutzke, 2003). En el primer caso la técnica se denomina fotometría de llama y ha sido utilizada por Yilmaz y Yavuz (1999) para la determinación de calcio, potasio y sodio en 30 muestras de miel de origen turco que fueron sometidas previamente a una calcinación. González-Paramás et al. (2000) utilizan esta técnica para la determinación de aluminio, cadmio, calcio, cloruro, cobalto, cobre, fosfato, hierro, magnesio, manganeso, níquel, potasio, sodio, sulfato y zinc calcinando previamente las 60 muestras de miel analizadas. Finalmente, Dag et al. (2006) determinaron azufre, boro, calcio, cobre, fósforo, hierro, magnesio, plomo, potasio, silicio, sodio y zinc mediante fotometría de emisión de llama en 350 mieles de aguacate procedentes de Israel. El tratamiento previo de las muestras consistió en una digestión asistida por microondas.

Cuando se utiliza un espectrofotómetro como instrumento de detección, los autores que han propuesto métodos de determinación de minerales en la miel mediante espectroscopía de emisión atómica de llama se indican en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3

Métodos de determinación de minerales en miel mediante espectroscopía de emisión atómica.

Autores	Minerales determinados	N	Preparación de la muestra
Rodríguez-Otero et al. (1994)	Potasio y sodio	91	Digestión ácida
Uren et al. (1998)	Potasio	74	Calcinación
Latorre et al. (1999)	Cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, níquel, litio, potasio, rubidio, sodio y zinc	42	Calcinación
Latorre et al. (2000)	Cobre, hierro, magnesio, manganeso, litio, potasio, rubidio, sodio y zinc	42	Calcinación
De Ferrer et al. (2004)	Potasio y sodio	30	Calcinación
Hernández et al. (2005)	Litio, potasio, rubidio y sodio	116	Calcinación
Nozal Nalda et al. (2005)	Potasio y sodio	73	Dilución y filtración
Khan et al. (2006)	Potasio, sodio y litio,	15	NI

NI: No indicado en el trabajo publicado

Latorre et al. (1999) y *Latorre et al. (2000)* buscan confirmar la autenticidad geográfica de las mieles de Galicia mediante el análisis de los minerales que contienen estas muestras, obteniendo una correcta clasificación mediante la combinación de los contenidos en cobre, litio y manganeso.

De Ferrer et al. (2004) hacen una descriptiva del contenido mineral de las muestras de miel que proceden de una determinada región de Venezuela en las que el mineral más abundante es el fósforo.

Finalmente, *Hernández et al. (2005)* determinan el contenido mineral de las muestras de miel con el objetivo de caracterizar las mieles de Canarias. En los análisis de componentes principales y cluster realizados en este trabajo se concluye que las mieles canarias se pueden caracterizar por su contenido en calcio, cobre, estroncio, magnesio, potasio y sodio. También, mediante el análisis discriminante y la regresión logística, son capaces de distinguir entre las mieles procedentes de Canarias y las que no proceden de estas islas basándose en el contenido mineral de las mismas.

5.2.2.2 Espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES)

El fundamento de esta espectroscopía es la utilización de un plasma como fuente de atomización y de excitación (*Miller y Rutzke, 2003*).

Esta técnica fue utilizada principalmente por *Terrab et al. (2003a, b, c)* y *Terrab et al. (2003d, e)* para la determinación de minerales en muestras de miel con el objetivo de caracterizar las mieles de eucalipto, de naranjo y otras mieles monoflorales de Marruecos. Concretamente, *Terrab et al. (2003d)* utilizan técnicas estadísticas para clasificar las mieles según su origen botánico y concluyen que se clasifican correctamente el 100% de las mieles de mielada y el 98% de las muestras de eucalipto.

En la Tabla 5.4 se muestra una relación de los autores que han desarrollado métodos de determinación de minerales en la miel mediante espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES).

En los últimos años, algunos fabricantes de instrumentos han comenzado a denominar a los equipos de AES como “espectrómetros de emisión óptica” (OES) puesto que miden la luz emitida cuando los átomos excitados se relajan al estado fundamental (*Miller y Rutzke, 2003*).

En este trabajo, se van a separar las referencias de determinación de minerales teniendo en cuenta si los autores han denominado a la técnica espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) o espectroscopía de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) aunque *Miller y Rutzke (2003)* las consideran la misma técnica.

Lachman et al. (2007) evalúan dos técnicas espectroscópicas diferentes: F-AAS e ICP-OES. Determinan minerales en 24 muestras de miel de la República Checa y concluyen que la técnica ICP-OES es más favorable en relación a rapidez de análisis y al coste.

Tabla 5.4 Métodos de determinación de minerales en miel mediante ICP-AES.

Autores	Minerales determinados	n	Preparación de la muestra
<i>Merin et al. (1998)</i>	Aluminio, arsénico, azufre, bario, boro, cadmio, calcio, cobalto, cobre, cromo, estaño, estroncio, fósforo, hierro, litio, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, plata, plomo, potasio, selenio, silicio, sodio, titanio, vanadio y zinc	69	Digestión ácida
<i>Al-Khalifa y Al-Arif (1999)</i>	Aluminio, boro, cadmio, cobre, fósforo, hierro, manganeso, plomo, potasio, sodio y zinc	10	NI
<i>Devillers et al. (2002)</i>	Aluminio, azufre, cadmio, calcio, cobalto, cobre, cromo, fósforo, hierro, litio, magnesio, manganeso, mercurio, molibdeno, níquel, plata, plomo y zinc	86	Digestión ácida
<i>Terrab et al. (2003a)</i>	Cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio y zinc	29	Calcinación
<i>Terrab et al. (2003b)</i>	Cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio y zinc	20	Calcinación
<i>Terrab et al. (2003c)</i>	Cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio y zinc	12	Calcinación
<i>Terrab et al. (2003d)</i>	Cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio y zinc	98	Calcinación
<i>Terrab et al. (2003e)</i>	Cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio y zinc	39	Calcinación
<i>Matei et al. (2004)</i>	Cromo, hierro, manganeso y níquel	4	Dilución
<i>Ioannidou et al. (2005)</i>	Cadmio, cobalto, cobre, cromo, manganeso, níquel, plomo y zinc	5	Dilución
<i>Nozal Nalda et al. (2005)</i>	Aluminio, boro, cadmio, calcio, cobalto, cobre, cromo, hierro, magnesio, manganeso, níquel, plomo y zinc	73	Dilución y filtración
<i>Afik et al. (2006)</i>	Azufre, boro, calcio, cobre, fósforo, hierro, magnesio, plomo, potasio, silicio, sodio y zinc	NI	Digestión asistida por microondas
<i>Bagci et al. (2007)</i>	Aluminio, arsénico, bario, bismuto, boro, calcio, estroncio, fósforo, indio, litio, níquel, plata, plomo, potasio, selenio, sodio, talio, vanadio y zinc	43	Digestión ácida
<i>Lachman et al. (2007)</i>	Aluminio, boro, calcio, cobre, magnesio, manganeso, níquel y zinc	24	Digestión ácida y centrifugación

NI: No indicado en el trabajo publicado

5.2.2.2.3 Espectroscopía de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)

Los autores que han desarrollado métodos de determinación de minerales en muestras de miel mediante espectroscopía de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) se resumen en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5 Métodos de determinación de minerales en miel mediante ICP-OES.

Autores	Minerales determinados	n	Preparación de la muestra
Díez et al. (2004)	Cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio y zinc	152	Calcinación
Terrab y Heredia (2004)	Azufre, calcio, fósforo, magnesio, potasio y sodio	25	Calcinación
Terrab et al. (2004a)	Aluminio, arsénico, azufre, bario, cadmio, calcio, cobalto, cobre, cromo, estroncio, fósforo, hierro, litio, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, potasio, plomo, selenio, silicio, sodio y zinc	24	Calcinación
Terrab et al. (2004b)	Azufre, calcio, fósforo, magnesio, potasio y sodio	25	Calcinación
Fernández-Torres et al. (2005)	Bario, boro, calcio, cobre, estroncio, fósforo, magnesio, manganeso, potasio, sodio y zinc	40	Digestión ácida
González-Miret et al. (2005)	Aluminio, arsénico, azufre, bario, berilio, cadmio, calcio, cobre, fósforo, hierro, litio, magnesio, manganeso, plomo, potasio, silicio, sodio y zinc	77	Calcinación
Terrab et al. (2005)	Aluminio, arsénico, azufre, bario, calcio, cobalto, cobre, cromo, fósforo, hierro, litio, magnesio, manganeso, níquel, plomo, potasio, selenio, silicio, sodio y zinc	11	Calcinación
Fredes y Montenegro (2006)	Aluminio, cadmio, cobalto, cobre, cromo, estroncio, hierro, manganeso, níquel, plomo y zinc	47	Digestión ácida / calcinación
Mendes et al. (2006)	Cadmio, calcio, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, níquel, plomo, potasio, sodio y zinc	81	Ultrasonificación / digestión asistida por microondas
Lachman et al. (2007)	Aluminio, boro, calcio, cobre, magnesio, manganeso, níquel y zinc	24	Digestión ácida y centrifugación
Montenegro y Fredes (2008)	Aluminio, cobre, estroncio, hierro, manganeso y zinc	61	Digestión ácida

Terrab y Heredia (2004) y *Terrab et al. (2005)* hacen uso de esta técnica espectroscópica para la determinación de minerales en muestras de miel con el objeto de caracterizar las mieles de aguacate y las de tomillo (*Terrab et al., 2004a; Terrab et al., 2004b*) procedentes de España y las mieles de mielada de Marruecos (*Díez et al., 2004*).

Fernández-Torres et al. (2005) utilizan esta técnica para la determinación de minerales en muestras de miel de cuatro espectros polínicos: *Citrus sp.*, *Erica*

sp., *Eucalyptus sp.* y *Rosmarinus sp.* Concluyen que, mediante el análisis de componentes principales y el análisis cluster, se demuestra que el contenido mineral de las mieles puede proporcionar suficiente información para llevar a cabo una clasificación entre los cuatro espectros polínicos estudiados. Además, se aplicó un análisis lineal discriminante obteniendo un reconocimiento del 100% y una predicción del 97%.

Fredes y Montenegro (2006) ensayan dos procedimientos de tratamiento previo de la muestra basados en la descomposición de la materia orgánica la digestión ácida y la calcinación para su posterior determinación mediante ICP-OES. Concluyen que, con ambos tratamientos previos se detectan todos los minerales objeto de estudio, aunque se consigue mayor resolución con la calcinación para los minerales analizados a excepción del cadmio, níquel, plomo y zinc.

Mendes et al. (2006) también evalúan dos métodos de preparación de las muestras de miel, la ultrasonificación y la digestión en microondas. Optimizan las condiciones de ambos métodos y concluyen que los dos son adecuados para evitar interferencias de otros compuestos existentes en las muestras de miel.

5.2.2.2.4 Espectroscopía por plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas (ICP-MS)

Se trata de la técnica espectroscópica asociada a un espectrómetro de masas como detector.

El primer trabajo que desarrolla la determinación de minerales en muestras de miel mediante esta técnica espectroscópica fue publicado por *Caroli et al. (1999)*. El objeto de este trabajo fue comparar dos técnicas de espectroscopía por plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas (una con espectrómetro de cuadrupolo y otra con espectrómetro de alta resolución) y la espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES). Analizan muestras de miel de dos colmenas diferentes por ICP-AES y/o alguna de las dos técnicas de espectroscopía por plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas (ICP-MS). Concluyen que algunos minerales (arsénico, cadmio y vanadio) solamente pueden ser determinados por la técnica de espectroscopía por plasma de acoplamiento inductivo a espectrometría de masas de alta resolución. Determinaron el manganeso y el

zinc únicamente mediante espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) y para el hierro, obtuvieron concentraciones similares cuando se determina mediante las dos técnicas de espectroscopía por plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas (ICP-MS).

Yazgan et al. (2006) proponen un método de determinación del cadmio, cobre, cromo, hierro, manganeso, níquel, plata, plomo y zinc mediante espectroscopía por plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas en 58 mieles florales y de mielada procedentes de Alemania. Su objetivo era comprobar si la miel se puede utilizar como indicador de contaminación analizando su contenido en plomo y concluyeron que la miel es un buen indicador. Además, ensayaron cuatro tratamientos previos de las muestras (análisis directo disolviendo la miel en agua, análisis directo disolviendo la miel en ácido nítrico, aplicación de presión para romper la matriz y calcinación) aunque no concluyen cual de ellos sería el más recomendable.

Este mismo método (ICP-MS) es también utilizado por *Bogdanov et al. (2007)* para la determinación de cadmio, cobre, cromo, hierro, manganeso, níquel, plomo y zinc en 95 muestras de Suiza en las que consiguen diferenciar entre muestras procedentes de ciudad, pueblo, zona rural y zona de montaña.

Madejczyk y Baralkiewicz (2008) utilizan esta técnica para la determinación de aluminio, boro, calcio, cobre, cromo, hierro, magnesio, manganeso, níquel, potasio, sodio y zinc en 30 mieles (florales y de mielada) procedentes de Polonia. Preparan la muestra previamente mediante digestión asistida por microondas y llevan a cabo un análisis cluster con las muestras concluyendo que el origen botánico de las mieles está correlacionado con su contenido mineral.

Por último, *Pisani et al. (2008)* determinaron aluminio, antimonio, arsénico, bario, cadmio, calcio, cobalto, cobre, cromo, estroncio, hierro, magnesio, manganeso, mercurio, níquel, plomo, potasio, selenio, sodio, talio, titanio, uranio y zinc en 51 muestras de miel mediante espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) o espectroscopía por plasma de acoplamiento inductivo a espectrometría de masas (ICP-MS) dependiendo de la concentración de cada elemento. Lo que no se refleja en la publicación son los elementos determinados mediante cada técnica o las concentraciones límite en las que se utiliza una u otra técnica.

5.2.2.3 Espectroscopía de fluorescencia con reflexión total de rayos X (TXRF)

Kump et al. (1996) llevan a cabo la determinación de minerales en muestras de diversos tipos de miel, polen y tejidos de abejas mediante espectroscopía de fluorescencia con reflexión total de rayos X (TXRF) y espectroscopía de fluorescencia de rayos X con excitación de radioisótopos (FRX). Comparan estas técnicas de rayos X con la espectroscopía de absorción atómica (AAS) y la espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) en términos de sensibilidad, precisión, exactitud, procedimientos de preparación de la muestra y, por último, en términos económicos. El método de espectroscopía de fluorescencia con reflexión total de rayos X (TXRF) que proponen es simple, rápido y suficientemente preciso, pero en muchos casos, carece de la sensibilidad necesaria para la determinación de elementos en concentraciones de 0,1 ppm. Además, es necesaria la completa digestión de la muestra previamente a su análisis. Por último, indican que la técnica de espectroscopía de fluorescencia de rayos X con excitación de radioisótopos (FRX), que no requiere ninguna preparación de la muestra, es muy competitiva en el análisis de los elementos con concentraciones por encima de 10 ppm.

Barisic et al. (1999) determinaron los minerales calcio, cobre, cromo, estroncio, hierro, manganeso, níquel, plomo, rubidio y zinc en 41 muestras de Croacia mediante espectroscopía de fluorescencia con reflexión total de rayos X (TXRF), concluyendo que las muestras de miel, principalmente las de mielada, pueden indicar las consecuencias de la contaminación global además de contaminaciones puntuales a nivel local.

Esta misma técnica es utilizada por *Golob et al. (2005)* para la determinación de arsénico, azufre, bromo, calcio, cloro, cobre, cromo, estroncio, fósforo, hierro, manganeso, níquel, plomo, potasio, rubidio y titanio en muestras de miel de diferentes espectros polínicos encontrando diferencias estadísticamente significativas en el contenido mineral de las muestras según su espectro polínico.

Enrich et al. (2007) determinan arsénico, bromo, calcio, cobre, cromo, estroncio, hierro, manganeso, plomo, rubidio, selenio, titanio y zinc mediante espectroscopía de fluorescencia con reflexión total de rayos X (TXRF) en 14 muestras de miel procedentes de Argentina. Ensayan diferentes condiciones de digestión por microondas como pretratamiento de las muestras, indicando que la digestión mineral es una buena alternativa a la calcinación convencional. Por

último, concluyen que la concentración de metales pesados en la miel puede ser una herramienta muy útil para determinar la presencia de contaminación ambiental.

5.2.3 Métodos cromatográficos

En la Tabla 5.6 se muestran las características de los métodos de cromatografía iónica para la determinación de minerales en la miel encontrados en la bibliografía consultada.

Tabla 5.6 Métodos de determinación de minerales en la miel mediante cromatografía iónica.

Referencia	Minerales	n	Preparación muestra	Fase móvil	Columna	Tiempo análisis (minutos)
<i>Pérez-Cerrada et al. (1989)</i>	Cloruro, fosfato y sulfato	1	NI	Na ₂ CO ₃ 1,8 mM; NaHCO ₃ 1,7 mM	HPIC AS4A con precolumna / HIPC AG4A / AMMS-1	10
<i>Poiana et al. (1996)</i>	Calcio, magnesio, potasio y sodio	105	Filtración	HCl 30 mM; DAP HCl 6 mM	Ionpac C53	16
	Cloruro, fluoruro, fosfato, nitrato y sulfato			Na ₂ CO ₃ 1,8 mM; NaHCO ₃ 1,7 mM	Ionpac AS4A-SC4	10
<i>Del Nozal et al. (2000)</i>	Fosfato, nitrato, oxalato, y sulfato	99	Extracción en fase sólida	Borato-gluconato de litio (1,4%); n-butanol (2%); acetonitrilo (12%); agua (84,6%)	IC-Pak A-HC	50
<i>Radovic et al. (2001)</i>	Amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio	40	Ultrasonificación	Metanosulfato 20 mM	IonPac CS12A+CG12A	NI
	Cloruro, fosfato, nitrato y sulfato			Na ₂ CO ₃ 3,5 mM; NaHCO ₃ 1,0 mM	IonPac AS14+AG14	NI

NI: No indicado en el trabajo publicado
DAP: Ácido 2,3-Diaminopropiónico

El método cromatográfico más comúnmente utilizado para la determinación de minerales en la miel es la cromatografía iónica con detector de conductividad, salvo en el caso de *Poiana et al. (1996)* que utilizan un detector electroquímico.

Pérez-Cerrada et al. (1989) proponen un método de determinación de aniones en una solución rica en azúcares. Este método se aplica después a una miel aunque no se indica el procedimiento de preparación de la muestra.

Radovic et al. (2001) determinan varios aniones y cationes en muestras de miel mediante dos métodos de cromatografía iónica, uno para cationes y otro para aniones, concluyendo que este análisis, en combinación con un análisis estadístico de los datos, puede ser útil para la identificación floral de las mieles.

5.2.4 Electroforesis capilar

Franchini et al. (2007) determinan calcio, litio, magnesio, manganeso, potasio y sodio en 14 muestras de miel brasileñas mediante electroforesis capilar de zona. Aplican el método de determinación de cationes propuesto en este trabajo (*Suárez-Luque et al., 2005*).



5.3 DETERMINACIÓN DE CATIONES MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

5.3.1 Parte experimental

5.3.1.1 Material y aparatos

El análisis electroforético se llevó a cabo con un Capillary Ion Analyzer (CIA System) Waters versión 1.3 equipado con una fuente de alimentación positiva y un detector UV-Vis de longitud de onda fija con lámpara de mercurio y filtro de 185 nm y módulo Waters bus SAT/IN. Para el tratamiento de los datos, se ha utilizado el sistema de adquisición y tratamiento de datos Millennium 2010 (v. 2.15) con opción CIA específica para electroforesis capilar.

El capilar utilizado es de sílice fundida Accusep Capillaries Waters de 60 cm x 75 µm I.D., con la ventana de detección a 7,5 cm del final del capilar.

También se han utilizado:

- ⇒ Viales de electrolito de polietileno en el carrusel de inyección y de cristal en el de detección (capacidad de 20 mL).
- ⇒ Viales de muestra Eppendorf de 600 µL.
- ⇒ Filtros de membrana de PTFE de 0,5 µm MFS.
- ⇒ Filtros de membrana de 0,45 µm Phenomenex AFO-0504.
- ⇒ pHmetro Crison microPH 2002.
- ⇒ Agitador magnético Selecta Agimatic-S.
- ⇒ Cronómetro digital Van Allen.
- ⇒ Material de uso común en el laboratorio.

5.3.1.2 Reactivos

Los patrones de los cationes analizados (bario, cadmio, calcio, cobre, litio, magnesio, manganeso, níquel, potasio y sodio) y el imidazol, componente del electrolito, han sido suministrados por Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). El ácido acético, también para el electrolito, ha sido suministrado por Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Para la preparación de las disoluciones se ha utilizado agua Milli-Q Millipore.

5.3.1.3 Procedimiento de trabajo

5.3.1.3.1 Preparación de las disoluciones patrón

Las disoluciones madre de los patrones se preparan disolviendo las sales de los analitos en agua Milli-Q y se almacenan a 4°C. Las disoluciones de trabajo

de los patrones se preparan diariamente mediante dilución de las disoluciones madre en agua Milli-Q.

5.3.1.3.2 Preparación de la muestra

Se pesa 1 g de miel y se disuelve en 10 mL de agua Milli-Q. A continuación, se pasa a través de un filtro de membrana de 0,5 μm y se inyecta directamente en el equipo de electroforesis capilar. Tanto las muestras como las soluciones patrón se inyectan por triplicado.

5.3.1.3.3 Condiciones electroforéticas

5.3.1.3.3.1 Preparación del electrolito

Se pipetea 10 mL de una solución de imidazol 0,1 M en un vaso de precipitados y se añaden aproximadamente 75 mL de agua Milli-Q. La disolución se lleva a pH 3,60 con ácido acético 1 M (aproximadamente 12 mL). Se enrasa a 100 mL en un matraz aforado y se filtra a vacío utilizando un filtro de membrana de 0,45 μm , dejando desgasificar la disolución durante unos minutos. Esta solución se prepara diariamente.

5.3.1.3.3.2 Acondicionamiento del capilar

Cuando se utiliza un capilar por primera vez, se debe llevar a cabo un proceso de acondicionamiento para asegurar que la superficie del capilar esté siempre homogénea. Las etapas a seguir consisten en purgar o lavar el capilar con las siguientes soluciones en el orden y los tiempos que se indican a continuación:

1. Agua Milli-Q durante 10 minutos.
2. NaOH 1 M durante 10 minutos.
3. NaOH 10 mM durante 10 minutos.
4. Agua Milli-Q durante 30 minutos.
5. Electrolito durante 60 minutos.

El capilar también debe ser acondicionado diariamente para que se rellene completamente con el electrolito y así obtener resultados reproducibles. Se sigue el protocolo de purga que se detalla a continuación:

1. NaOH 10 mM durante 10 minutos.
2. Agua Milli-Q durante 30 minutos.

3. Electrolito durante 60 minutos.

El hecho de purgar el capilar con una disolución alcalina hace que se regenere la superficie de sílice eliminando iones o cualquier otro soluto que se encuentre retenido en las paredes internas del capilar. Debido a que la sílice es soluble en disoluciones básicas, algo de la misma se va a disolver quedando al descubierto una “nueva” sílice (Cruces, 1998).

5.3.1.3.3.3 Lavado del capilar

Se realizan dos tipos de lavado:

a) Entre inyecciones se purga con electrolito durante 2 minutos para eliminar los restos de la inyección anterior.

b) Una vez finalizadas todas las inyecciones, se purga con NaOH 10 mM durante 10 minutos y a continuación con agua Milli-Q durante 30 minutos, para eliminar el electrolito y evitar la adsorción de sustancias orgánicas en las paredes del capilar.

Cuando no se vaya a utilizar el capilar durante algún tiempo es conveniente limpiarlo con una mezcla de agua y metanol y secarlo realizando una purga con el extremo de inyección del capilar libre.

5.3.1.3.3.4 Condiciones de separación

Estas condiciones se describen en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7 Condiciones de separación del método de electroforesis capilar utilizado para la determinación de los cationes en este trabajo.

Inyección	Modo de inyección	Hidrodinámico (elevación 10 cm)
	Tiempo de inyección	30 segundos
Separación	Capilar	60 cm x 75 µm ID
	Temperatura	25°C
	Voltaje	25 KV
Detección	Modo de detección	UV indirecta
	Longitud de onda	185 nm
	Velocidad de adquisición de datos	20 puntos/segundo
Tiempo de análisis		4 minutos

5.3.2 Resultados y discusión

El método que se propone permite la identificación y cuantificación de los cationes potasio, bario, calcio, sodio, magnesio, manganeso, níquel, cadmio, litio y cobre en un tiempo total de análisis inferior a 4 minutos.

En la Figura 5.3 se puede observar un electroferograma de una mezcla de patrones de estos cationes. La concentración de los mismos en la mezcla es de 5 mg/L para el potasio, bario y cobre y 1 mg/L para los restantes cationes.

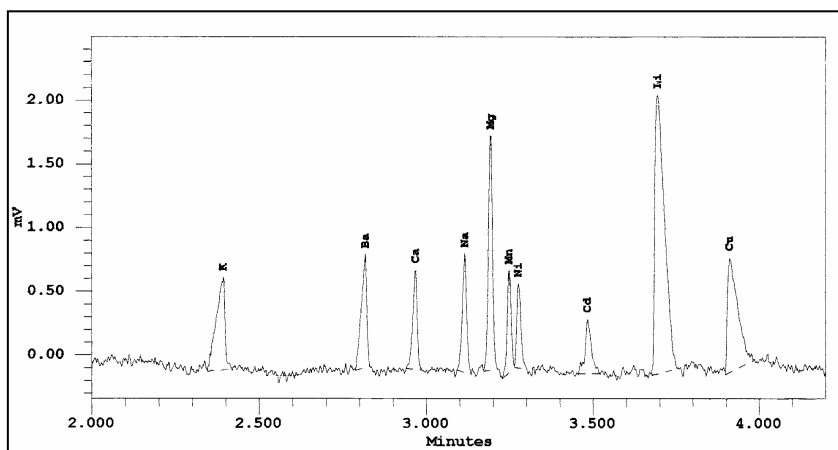


Figura 5.3 Electroferograma de una mezcla de cationes separados mediante el método de electroforesis capilar propuesto en este trabajo.

5.3.2.1 Aplicación del método en muestras de miel

Cuando el método analítico descrito se aplica a muestras de miel, se observa que es posible la determinación y cuantificación de los cationes potasio, calcio, sodio, magnesio, manganeso, níquel y litio, que representan más del 99% del contenido total de cationes en las muestras de miel (*White, 1978*).

El método de determinación de cationes en muestras de miel mediante electroforesis capilar que se propone en este trabajo ha sido publicado en el *Journal of Chromatography A* (*Suárez-Luque et al., 2005*) [ANEXO I].

En la Figura 5.4 se muestran dos electroferogramas de los cationes analizados mediante el método propuesto en dos muestras de miel con diferente contenido en cationes. El bario se ha añadido como compuesto de referencia para el cálculo de los tiempos de migración relativos.

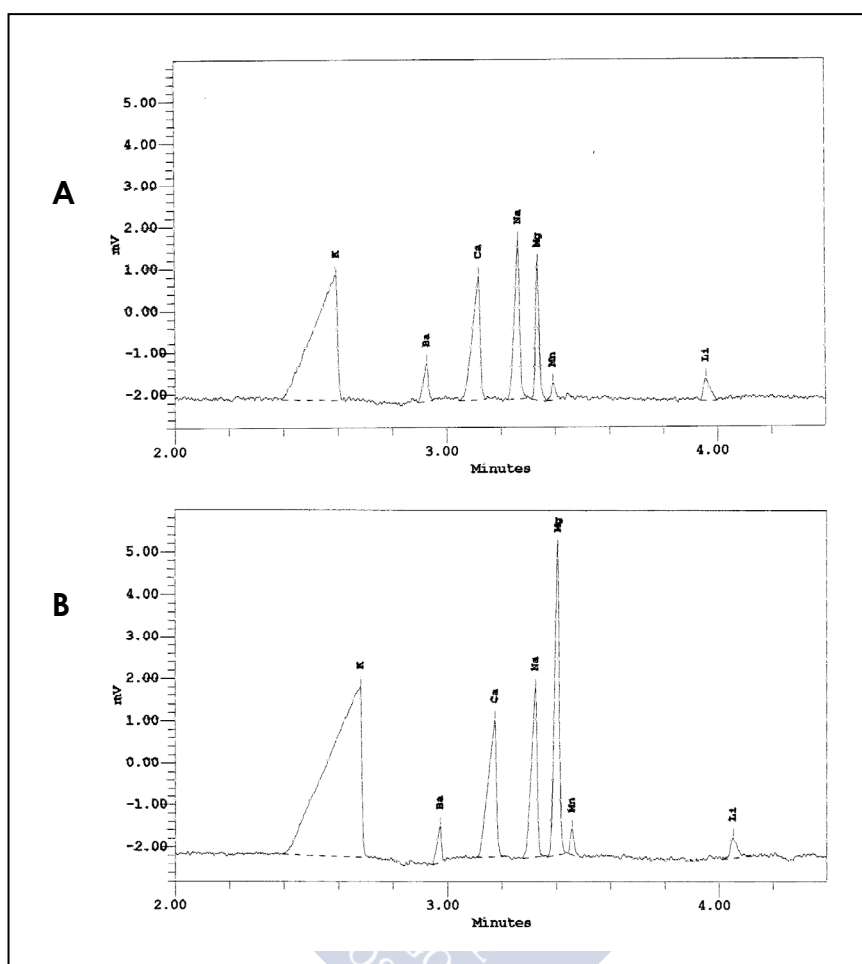


Figura 5.4 Electroferograma de los cationes analizados mediante el método propuesto en dos muestras de miel, una de *Eucalyptus* sp. (A) y otra de *Castanea sativa* Miller (B). El bario se ha añadido como compuesto de referencia para el cálculo de los tiempos de migración relativos.

5.3.2.1.1 Puesta a punto del método

5.3.2.1.1.1 Condiciones electroforéticas

5.3.2.1.1.1.1 Composición del electrolito

La elección de electrolito es fundamental en la electroforesis capilar de zona, debiéndose elegir un compuesto cuya movilidad sea similar a la de los analitos objeto de análisis con el fin de evitar distorsiones en la forma de los picos (Heiger, 1992).

Lee y Lin (1994) determinaron la movilidad de los compuestos imidazol, piridina y bencilamina para ser utilizados como electrolitos. Concluyeron que la movilidad del imidazol era la más compatible con los iones metálicos de manera que estos iones se separan mejor en este electrolito. Además de esta movilidad electroforética similar a la de los cationes metálicos, el imidazol es un buen agente de visualización en electroforesis capilar con detección ultravioleta indirecta por lo que se considera el electrolito más eficaz en la separación de cationes (François et al., 1995).

a) Efecto de la concentración de imidazol

Una vez elegido el imidazol como electrolito, se estudió el efecto de su concentración entre 5 y 20 mM, manteniendo el pH constante de 3,6. Se observó que al aumentar la concentración de imidazol, se alargan los tiempos de migración de los cationes (Fig. 5.5), por lo que se seleccionó la concentración de imidazol 10 mM como óptima, al obtenerse la separación de todos los cationes en el menor tiempo de análisis.

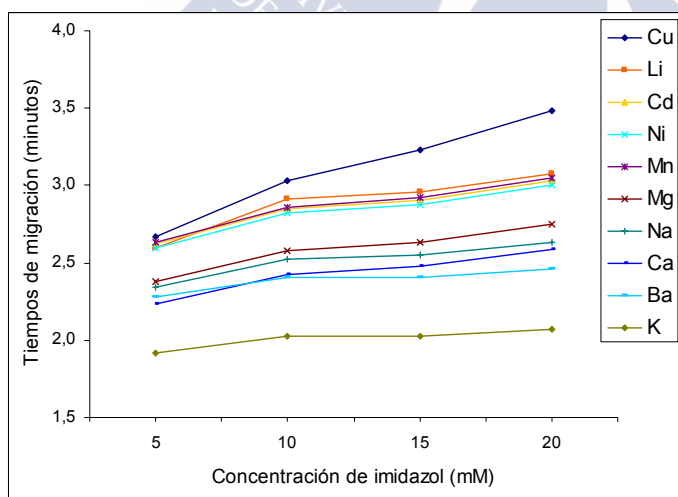


Figura 5.5 Efecto de la concentración de imidazol en los tiempos de migración de los cationes (ácido acético 1 M hasta pH 3,60, 25 kV, 25°C).

b) Influencia del agente complejante en la composición del electrolito

Lin et al. (1993) observaron que el ácido que se añade al electrolito para ajustar el pH del mismo, afecta a la resolución y al orden de migración de los iones. Si se utiliza ácido clorhídrico, los cationes sodio y potasio eluyen juntos. También observaron que los ácidos acético, glicólico, láctico y α -hidroxiisobutírico afectan de un modo similar en la separación de los cationes. De todos ellos, el ácido acético es el más utilizado y el más económico por lo que se seleccionó éste para ajustar el pH del electrolito.

c) Selección del pH del electrolito

Otro de los parámetros que influyen en la resolución de los analitos hasta la línea base es el pH (Lin et al., 1993). Se evaluó el efecto del pH del electrolito en un rango de 3,50 a 5,00. Al aumentar el pH se observa que los tiempos de migración disminuyen aunque a valores de pH superiores a 3,60 existe solapamiento de los cationes. También se comprobó que a un pH superior a 4,50, el cobre no se detecta (Fig. 5.6). Por esta razón, se eligió el valor de 3,60 como pH del electrolito ya que se separan todos los cationes en el menor tiempo de análisis.

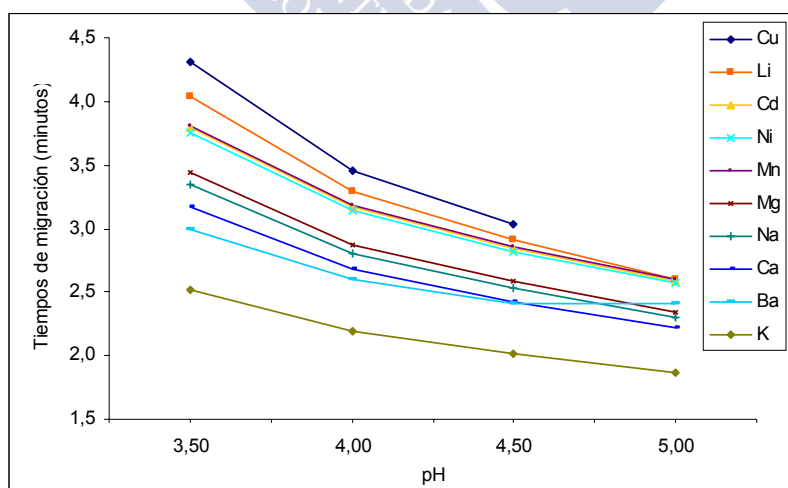


Figura 5.6 Efecto del pH del electrolito en la separación de los cationes (imidazol 10 mM y ácido acético, 25 kV, 25°C).

5.3.2.1.1.1.2 Efecto del voltaje de migración

Se estudió el efecto del voltaje en la separación y la resolución de los cationes. Como se puede observar en la Figura 5.7, al aumentar el voltaje, el tiempo de análisis disminuye pero se compromete la completa separación de los cationes. Por ello, se seleccionó un voltaje de 25 kV ya que se obtiene la separación de todos los cationes en 4 minutos.

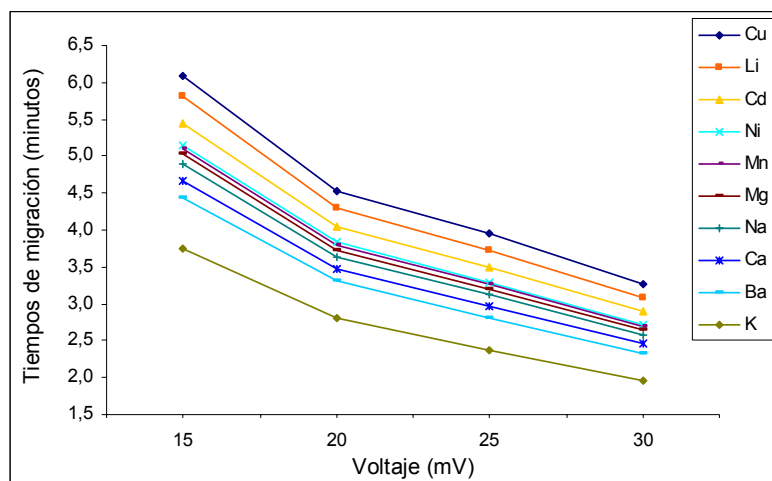


Figura 5.7 Efecto del voltaje en la separación de los cationes (imidazol 10 mM y ácido acético 1 M hasta pH 3,60, 25°C).

5.3.2.1.1.1.3 Influencia de la temperatura

La temperatura afecta a varios parámetros físico químicos del electrolito como la viscosidad, la constante dieléctrica o el pH y, por ello, afecta a la velocidad del flujo electroosmótico y a la movilidad de los analitos. *François et al.* (1995) estudiaron el efecto de 5 temperaturas (20, 25, 30, 35 y 40°C) en la separación de varios cationes. Concluyeron que variaciones de temperatura en el rango de 20-40°C no alteran significativamente la selectividad de la separación. Se comprobó este hecho y se obtuvieron los mismos resultados. Por esta razón y para simplificar al máximo el proceso, se seleccionó la temperatura de 25°C como temperatura de trabajo.

5.3.2.1.1.2 Tiempos de migración

Uno de los mayores inconvenientes que surgen al estudiar la reproducibilidad en un método de análisis mediante electroforesis capilar es la fluctuación en los

tiempos de migración absolutos (Yang *et al.*, 1996), de manera que en métodos en los que los analitos eluyen muy seguidos, como el que se propone en este trabajo, se dificulta la identificación de los mismos. Para resolver este problema, algunos autores utilizan los tiempos de migración relativos respecto a un compuesto de referencia que no debe estar presente en las muestras en los límites de detección del método (Heiger, 1992; Jones, 1993).

Se ha visto que cuando se utilizan los tiempos de migración relativos en vez de los tiempos de migración absolutos, las variaciones debidas a la diferente conductividad de las muestras, diferente concentración de los analitos o pequeñas fluctuaciones en las condiciones electroforéticas (como por ejemplo, la temperatura, el voltaje, la composición del electrolito, etc.) se minimizan. Esto se pone de manifiesto en la Figura 5.8 en la que se representan los tiempos de migración absolutos y relativos (calculados con el bario como compuesto de referencia), a diferentes valores de voltaje, observándose como los tiempos de migración relativos son más constantes que los absolutos al modificar el voltaje aplicado.

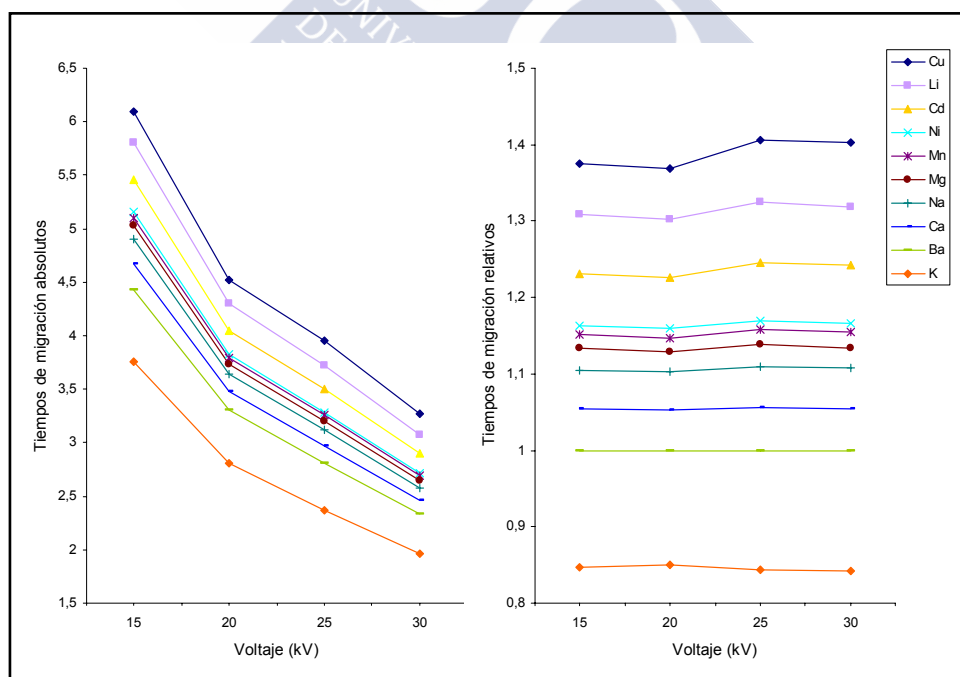


Figura 5.8 Variación de los tiempos de migración absolutos y relativos respecto al bario de los cationes objeto de estudio con respecto al voltaje aplicado (kV).

5.3.2.1.1.3 Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD) de un método se define como la concentración más baja de un analito que produce una respuesta detectable superior al nivel de ruido del sistema, mientras que el límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración más baja que puede ser determinada con precisión y exactitud (Green, 1996; Jenke, 1996). El límite de detección (LOD) se calcula como $sb + 3s$ y el límite de cuantificación (LOQ) como $sb + 10s$, donde sb es la señal media de diez inyecciones de un blanco (ruido) y s la desviación estándar. La señal de cada una de las inyecciones del blanco es el área en valor absoluto comprendida entre el tiempo de migración absoluto $\pm 1\%$. Una vez obtenida la señal para cada catión, ésta se transforma en concentración mediante la recta de calibrado correspondiente (ACS, 1980).

En la Tabla 5.8 se muestran los límites de detección y cuantificación de los cationes analizados. Los límites de detección obtenidos se encuentran entre 0,02 mg/kg para el litio y 48,2 mg/kg para el potasio. En lo que se refiere a los límites de cuantificación, oscilan entre 0,41 mg/kg para el níquel y 48,7 mg/kg para el potasio.

Tabla 5.8

Límites de detección y cuantificación y coeficientes de correlación (r) de las rectas de calibrado de los cationes analizados.

Catión	Límite de detección (mg/kg)	Límite de cuantificación (mg/kg)	r
Potasio	48,2	48,7	0,9994
Bario	2,87	9,94	0,9996
Calcio	0,15	3,62	0,9999
Sodio	0,08	4,77	0,9999
Magnesio	0,61	1,56	0,9999
Manganeso	1,84	3,10	0,9996
Níquel	0,14	0,41	0,9996
Cadmio	1,36	4,52	0,9997
Litio	0,02	0,87	0,9995
Cobre	5,29	7,98	0,9996

5.3.2.1.1.4 Curvas de calibrado

La cuantificación de los cationes objeto de estudio se ha realizado mediante un método de calibración externa. Las curvas de calibrado se han construido con una mezcla de patrones de siete concentraciones crecientes inyectando cada punto por triplicado. La curva de calibrado para cada catión se ha obtenido representando las áreas de los picos frente a las concentraciones (mg/kg) y aplicando el método de mínimos cuadrados. En la Tabla 5.8 se reflejan los coeficientes de correlación (r) de las curvas obtenidas. Éstas son lineales en un amplio intervalo de concentraciones, desde el límite de cuantificación hasta, al menos, 10 g/kg para el potasio; 0,2 g/kg para el calcio; 0,4 g/kg para el sodio y el magnesio, 0,1 g/kg para manganeso y níquel y 50 mg/kg para el litio.

De todos los cationes separados e identificados mediante el método propuesto no se han encontrado bario, cadmio y cobre en las muestras de miel, en los límites de detección del método analítico.

5.3.2.1.1.5 Precisión

La precisión es una medida del grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar un procedimiento analítico varias veces consecutivas (repetibilidad) o en diferentes intervalos de tiempo (reproducibilidad). Se determina mediante las desviaciones estándar relativas (RSD) que se expresan en tanto por ciento (*Miller y Miller, 2002*).

Este estudio de precisión se ha llevado a cabo mediante ensayos de repetibilidad y de reproducibilidad en 3 muestras de miel con contenido bajo, medio y alto en cationes. La repetibilidad se ha calculado inyectando 5 veces cada muestra y la reproducibilidad se ha determinado mediante el análisis de las muestras en 3 días diferentes a lo largo de un mes. Se ha realizado tanto para los tiempos de migración como para la concentración de cationes.

5.3.2.1.1.5.1 Tiempos de migración

Como se ha comentado anteriormente, se ha utilizado el bario como compuesto de referencia para la identificación de los cationes en las muestras ya que no se encuentra presente en las muestras de miel en los límites de detección de este método analítico.

Las desviaciones estándar relativas (RSD%) obtenidas para la repetibilidad y la reproducibilidad son inferiores a 1,55 y 2,27%, para los tiempos de migración absolutos y menores a 0,44 y 0,56%, respectivamente, para los tiempos de migración relativos (Tabla 5.9). Los porcentajes de variación de los tiempos de migración absolutos no supondrían un problema si los cationes salieran más separados en el electroferograma, pero en este caso, se hace necesario el empleo de los tiempos de migración relativos para facilitar la identificación de los mismos.

Tabla 5.9

Resultados de precisión (RSD%) del método propuesto para los tiempos de migración absolutos y relativos.

Catión	Repetibilidad (n=5)	
	Tiempo de migración absoluto	Tiempo de migración relativo
Potasio	1,04	0,16
Calcio	1,25	0,08
Sodio	1,30	0,15
Magnesio	1,34	0,19
Manganeso	1,37	0,21
Níquel	1,42	0,32
Litio	1,55	0,44
Catión	Reproducibilidad (n=3)	
	Tiempo de migración absoluto	Tiempo de migración relativo
Potasio	1,62	0,21
Calcio	1,85	0,11
Sodio	1,94	0,20
Magnesio	1,98	0,25
Manganeso	2,01	0,28
Níquel	2,15	0,39
Litio	2,27	0,56

5.3.2.1.1.5.2 Concentración de cationes

Las desviaciones estándar relativas (RSD%) de la repetibilidad y de la reproducibilidad son inferiores a 2,84 y 6,62%, respectivamente, para las concentraciones de los cationes objeto de estudio en las tres muestras de miel (Tabla 5.10). En este caso, se realizó un análisis de la varianza para determinar si las diferencias entre las repeticiones (cinco en el caso de la repetibilidad y tres para la reproducibilidad) son estadísticamente significativas. Todos los valores de p obtenidos son mayores de 0,05, de manera que se concluye que las diferencias no son estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95%, por lo que el método estudiado es preciso para la determinación de cationes en muestras de miel.

Tabla 5.10

Resultados de precisión (RSD%) del método propuesto para la concentración de las muestras.

Cación	Repetibilidad (n=5)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Potasio	1,68	0,09	0,05
Calcio	1,05	0,30	0,42
Sodio	1,41	1,05	1,92
Magnesio	2,07	0,55	0,44
Manganeso	2,84	0,68	0,94
Níquel	2,83	-	-
Litio	0,57	0,14	2,02
Cación	Reproducibilidad (n=3)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Potasio	1,41	2,03	2,98
Calcio	0,94	1,98	4,75
Sodio	0,41	2,66	6,36
Magnesio	0,99	3,50	6,19
Manganeso	4,31	1,26	2,80
Níquel	4,23	-	-
Litio	1,65	0,42	6,62

5.3.2.1.1.6 Exactitud

Se estudió la exactitud del análisis de los cationes mediante el método de las adiciones estándar. Diferentes cantidades de cada analito se adicionaron a las mismas cantidades de muestra y se llevaron a un volumen constante. En la Tabla 5.11 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para cada catión.

Para determinar la existencia o no de un efecto matriz, se realiza un análisis de recuperación con diferentes cantidades iniciales de muestra. Si las líneas de regresión obtenidas en este análisis son paralelas, se puede concluir que no existe un efecto matriz. Se analizaron dos cantidades diferentes de muestra de miel, se dibujaron las líneas de regresión y se determinó si éstas eran paralelas mediante un análisis de sus pendientes. Se realizó un test estadístico para comparar estas pendientes y se obtuvieron valores de p mayores de 0,05 en todos los casos (Tabla 5.11). Por ello, se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de las líneas de regresión a un nivel de confianza del 95%, de manera que no existe efecto matriz para la determinación de cationes en muestras de miel mediante el método propuesto.

Tabla 5.11

Recuperaciones obtenidas mediante el método de las adiciones estándar para los cationes analizados y valores de p del estudio de comparación de las pendientes de las rectas de regresión obtenidas al estudiar el efecto matriz.

Catión	Recuperación (%) \pm SD	p-valor
Potasio	96,7 \pm 2,5	0,8209
Calcio	100,4 \pm 1,2	0,5368
Sodio	100,5 \pm 1,1	0,2223
Magnesio	100,9 \pm 1,8	0,1535
Manganeso	101,8 \pm 3,3	0,2603
Níquel	88,5 \pm 2,9	0,7322
Litio	99,7 \pm 1,7	0,2423

5.3.2.1.2 Contenido en cationes de las muestras analizadas

En la Tabla 5.12 y en la Figura 5.9 se muestran los valores y la distribución del contenido de cada catión en las 125 muestras analizadas. En esta figura se puede observar que, en general, las concentraciones de cada catión se agrupan en un valor predominante.

Tabla 5.12

Contenido de los cationes (mg/kg) obtenido para el total de las muestras de miel analizadas.

Catión	Promedio \pm SD	Vmín-Vmáx
Potasio	1201 \pm 770	288-4742
Calcio	81,0 \pm 28,4	13,8-174,2
Sodio	58,9 \pm 51,6	5,7-252,6
Magnesio	53,9 \pm 53,3	6,7-238,4
Manganeso	7,64 \pm 8,23	ND-51,66
Níquel	0,52 \pm 3,38	ND-36,31
Litio	1,69 \pm 1,34	ND-6,49
Total cationes	1411 \pm 820	341-4985

ND: No detectable

En el caso del contenido en potasio, la mayoría de las muestras se concentran en valores entre 0,5 y 2 g/kg existiendo alguna miel cuyo contenido en potasio es muy superior. Esto mismo ocurre cuando se observa la distribución del contenido total en cationes, lo cual es predecible porque el potasio es el catión mayoritario, suponiendo el 84% del contenido total en cationes en las muestras de miel analizadas.

En el caso de los cationes manganeso, níquel y litio cabe destacar que existen muestras cuyo contenido se encuentra por debajo del límite de detección o de cuantificación del método propuesto. Este número es especialmente importante en el caso del níquel cuyo contenido se encuentra por debajo del límite de detección en 113 mieles y, por debajo del límite de cuantificación en 2 muestras.

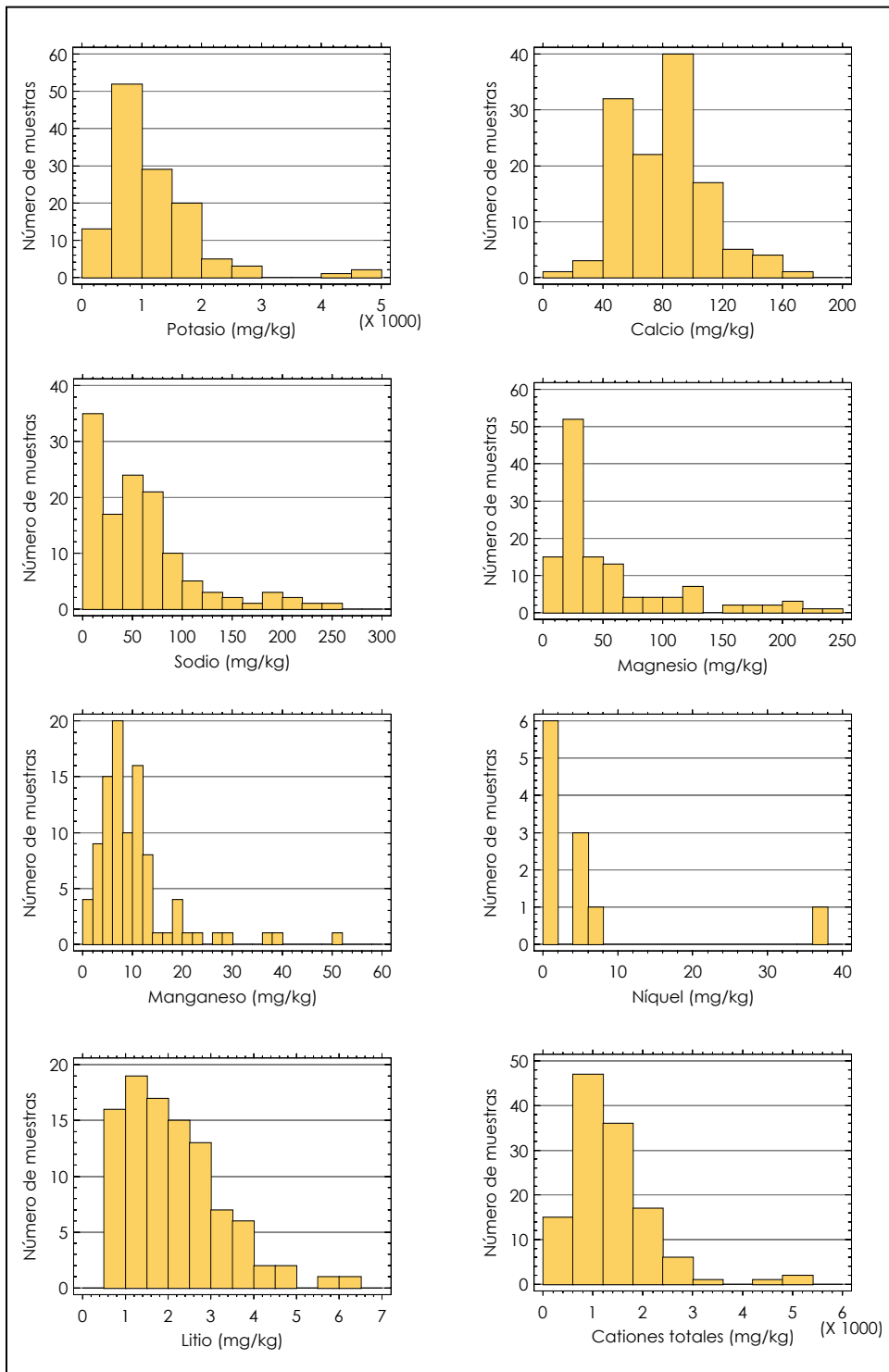


Figura 5.9. Distribuciones del contenido de los cationes determinados en las mieles analizadas.

En relación al manganeso, 30 muestras se encuentran por debajo del límite de detección y 2 por debajo del límite de cuantificación. Por último, el contenido en litio se encuentra por debajo del límite de detección en 26 muestras y por debajo del límite de cuantificación en 13 mieles.

Cabe destacar que existe una muestra cuyo contenido en níquel es anormalmente elevado (36 mg/kg, frente a un contenido promedio de 0,5 mg/kg). Este hecho puede ser debido a que esta muestra procede de una zona geográfica donde existe un alto grado de polución (*Tong et al., 1975; Barisic et al., 1999; Przybylowski y Wilczynska, 2001; Rodríguez García et al., 2006; Tuzen et al., 2007*). Se trata de una miel procedente de la comarca del Bierzo (León) y la capital berciana se encuentra entre las 50 ciudades españolas con más polución (*Méndez, 2007*).

5.3.2.1.2.1 Comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los publicados por otros autores

Otros autores han llevado a cabo la determinación de cationes en muestras de miel mediante diversas técnicas analíticas. Se han recopilado los contenidos en los cationes, objeto de estudio, obtenidos por otros autores y se han agrupado en función del país de origen de las muestras. El resultado se resume en la Tabla 5.13.

Al observar esta tabla, se podría indicar que en la bibliografía consultada existe una gran cantidad de muestras españolas. Esto es muy útil para comparar con las muestras analizadas en este trabajo. Al llevar a cabo esta tarea, se observa que el contenido en cationes obtenido en las muestras analizadas en este estudio es comparable al obtenido en las muestras españolas que se encuentran en la bibliografía consultada, salvo en el caso del contenido en litio ya que, en las muestras analizadas en este trabajo, es muy inferior al obtenido en el resto de muestras españolas. En cuanto al níquel, los niveles en la mayoría de los países son inferiores a 3 mg/kg. Sin embargo en este trabajo se han encontrado 5 muestras con niveles superiores a este valor. Esto tampoco es comparable con el resto de mieles españolas ya que los valores encontrados en estas muestras son inferiores a 3,4 mg/kg de níquel.

Tabla 5.13

Contenido en cationes de las mieles determinadas por otros autores y clasificadas según su país de origen. Se muestran los contenidos mínimo y máximo en mg/kg.

País	Autores	n	Potasio	Calcio	Sodio	Magnesio	Manganeso	Níquel	Litio
Alemania	Yazgan et al. (2006)	58	-	-	-	-	0,23 - 22	0,03 - 1,6	-
Arabia Saudí	Abu-Tarboush et al., (1993); Al-Khalifa y Al-Arifly (1999); Osman et al. (2007)	16 ^[1]	9 - 1367	1,5 - 28	10 - 133	18 - 23	0,03 - 0,37	-	-
Argentina	Baroni et al. (2009)	75	13 - 744	9 - 80	6 - 194	1 - 118	0 - 1,8	ND	-
Brasil	Azeredo et al. (1998); Franchini et al. (2007); Dos Santos et al. (2008)	98	115 - 4882	1,2 - 166	23 - 840	12 - 185	ND - 132	-	1,5 - 2,9
Chile	Fredes y Montenegro (2006); Montenegro y Fredes (2008)	108	-	-	-	-	0,01 - 6,97	0,01 - 1,48	-
Croacia	Barisic et al. (1999)	41	-	7 - 593	-	-	<0,1 - 11,9	<0,005 - 0,472	-
Egipto	Rashed y Soltan (2004)	10	213 - 1500	-	378 - 478	102 - 300	0,5 - 1,7	1,2 - 4,1	-
Eslovenia	Golob et al. (2005)	79	180 - 5800	0,9 - 270	-	-	0,3 - 9,1	0,21 - 1,15	-
España	14 Referencias ^[2]	748	38 - 3879	14 - 420	9 - 693	4 - 308	NQ - 27	NQ - 3,4	NQ - 38
Francia	Devillers et al. (2002)	86	-	15 - 654	-	7 - 547	NQ - 214	ND - 1,7	0,15 - 1,2
Grecia	Ioannidou et al. (2005)	5	-	-	-	-	0,11 - 7,22	ND	-
India	Nanda et al. (2003)	30	490 - 933	33 - 85	98 - 304	-	-	-	-
Irlanda	Downey et al. (2005)	50	410 - 714	75 - 175	41 - 196	19 - 53	0,9 - 10	-	-
Israel	Merin et al. (1998); Dag et al. (2006)	419	189 - 3768	58 - 310	23 - 132	17 - 205	0,3 - 0,6	0,3 - 1	-
Italia	Poiana et al. (1996); Caroli et al. (1999); Conti et al. (2007); Pisani et al. (2008)	179	147 - 6531	9 - 409	6 - 344	8 - 159	0,08 - 16,9	0,017 - 2,76	-
Macedonia	Stankovska et al. (2008)	123	169 - 3323	4 - 170	0,3 - 15	4 - 182	0,2 - 82	-	-
Marruecos	Terrab et al. (2003a, b, c); Terrab et al. (2003d, e); Díez et al. (2004)	350	15 - 2388	62 - 280	-	4 - 230	0,03 - 11,5	-	-
Nigeria	Omode y Ademokola, (2008)	5	-	144 - 270	-	-	-	5 - 13	-
Pakistán	Khan et al. (2006)	15	214 - 827	-	1 - 96	-	0,5 - 9	0,22 - 2,4	7,5 - 54,4
Polonia	Pohl y Prusisz (2006); Madejczyk y Baralkiewicz (2008); Juszcak et al. (2009)	46	8 - 3659	3 - 129	0,4 - 90	1 - 77	0,2 - 7,4	0,02 - 1,3	-
República Checa	Lachman et al. (2007)	24	-	11 - 142	-	18 - 89	1,2 - 9	0,06 - 1,5	-
Rumania	Matei et al. (2004)	4	-	-	-	-	1,7 - 2,2	0,9 - 2,0	-
Suiza	Bogdanov et al. (2007)	95	-	-	-	-	0,12 - 12,3	<0,001 - 2,0	-
Turquía	10 Referencias ^[3]	264	106 - 7340	3 - 900	9 - 163	2 - 111	0,0 - 74,2	ND - 2,2	-
Venezuela	De Ferrer et al. (2004)	30	379 - 5071	144 - 367	155 - 444	26 - 120	0,4 - 0,84	-	-

^[1] El número de muestras no se indica en el trabajo Osman et al. (2007)

^[2] Referencias de España: (Rodríguez-Otero et al., 1992; Rodríguez-Otero et al., 1994; Rodríguez-Otero et al., 1995; Latorre et al., 1999; López-García et al., 1999; González-Paramás et al., 2000; Terrab et al., 2004a; Terrab et al., 2004b; Fernández-Torres et al., 2005; González-Miret et al., 2005; Hernández et al., 2005; Nozal Nalda et al., 2005; Terrab et al., 2005; Rodríguez García et al., 2006)

^[3] Referencias de Turquía: Üren et al., 1998; Yılmaz y Yavuz, 1999; Erbilir y Erdogan, 2005; Bagci et al., 2007; Kucuk et al., 2007; Turhan, 2007; Tuzen et al., 2007; Yarsan et al., 2007; Silici et al., 2008; Turhan et al., 2008)

ND: No detectable NQ: No cuantificable

Cuando se comparan los resultados obtenidos en este trabajo con los contenidos que se muestran para mieles procedentes de otros países, se podría destacar que algunas mieles de Turquía muestran niveles muy altos de potasio. Además, las muestras de Pakistán tienen un contenido muy bajo en potasio y muy alto en litio. En algunas muestras turcas se han observado niveles en calcio anormalmente elevados, mientras que este catión se presenta en niveles bajos en las muestras de Arabia Saudí. Algunas muestras brasileñas presentan alto contenido en sodio, las mieles de Arabia Saudí muestran bajos niveles en magnesio y en algunas muestras francesas se han observado niveles altos en magnesio y manganeso.

5.3.2.1.2.2 Resultados obtenidos según el origen botánico de las mieles

En la Tabla 5.14 se pueden observar los resultados obtenidos en las muestras analizadas agrupados según el origen botánico de las mismas.

Tabla 5.14

Contenido en cationes (mg/kg) de las muestras de miel analizadas agrupadas según su origen botánico.

Origen botánico	n	Potasio	Calcio	Sodio	Magnesio	Manganeso	Níquel	Litio	Total
<i>Castanea sativa</i> Miller	4	3435 ± 1478 (1994 – 4742)	104,9 ± 25,6 (84,1 – 142,2)	43,7 ± 23,9 (25,4 – 78,7)	108,7 ± 70,4 (49,0 – 209,3)	13,30 ± 10,46 (6,39 – 28,73)	ND	4,40 ± 2,18 (1,93 – 6,49)	3725 ± 1430 (2233 – 4985)
<i>Citrus</i> sp.	2	359 ± 39 (331 – 386)	53,9 ± 3,1 (51,7 – 56,1)	14,3 ± 5,1 (10,7 – 17,8)	10,0 ± 2,4 (8,3 – 11,7)	ND	ND	0,87	438 ± 28 (418 – 458)
<i>Diplotaxis</i> sp.	1	399	86,0	31,6	21,8	17,20	ND	0,87	573
<i>Echium</i> sp.	1	353	42,3	38,8	18,2	ND	ND	2,52	455
<i>Erica</i> sp.	2	2244 ± 614 (1809 – 2678)	77,7 ± 18,1 (64,9 – 90,5)	30,1 ± 1,7 (28,9 – 31,2)	118,0 ± 95,0 (50,8 – 185,2)	20,66 ± 24,48 (3,35 – 37,97)	ND	3,11 ± 2,62 (1,26 – 4,97)	2515 ± 783 (1961 – 3068)
<i>Eucalyptus</i> sp.	25	791 ± 180 (614 – 1474)	101,1 ± 24,2 (71,3 – 174,2)	102,8 ± 60,2 (43,0 – 239,3)	24,2 ± 15,6 (15,8 – 96,9)	7,94 ± 2,97 (ND – 12,74)	0,10 ± 0,30 (ND – 1,13)	1,23 ± 1,25 (ND – 3,95)	1037 ± 214 (849 – 1739)
<i>Lavandula</i> sp.	4	959 ± 431 (527 – 1469)	65,0 ± 14,6 (50,7 – 82,3)	12,8 ± 3,6 (8,7 – 16,1)	43,3 ± 49,2 (13,4 – 116,8)	2,97 ± 5,95 (ND – 11,90)	ND	0,94 ± 0,70 (ND – 1,63)	1087 ± 495 (606 – 1697)
<i>Rosmarinus</i> sp.	6	541 ± 252 (294 – 969)	47,2 ± 18,9 (13,8 – 68,9)	13,6 ± 3,8 (10,6 – 18,4)	16,3 ± 7,0 (9,1 – 29,1)	1,87 ± 2,40 (ND – 6,02)	1,72 ± 2,67 (ND – 5,45)	2,15 ± 1,57 (ND – 4,64)	624 ± 264 (341 – 1060)
<i>Rosmarinus</i> y <i>Trifolium</i> sp.	1	1644	100,7	11,2	120,4	ND	ND	ND	1877
<i>Rubus</i> sp.	1	1420	37,6	57,5	34,6	3,47	ND	1,51	1554
<i>Trifolium</i> L. sp.	2	454 ± 207 (308 – 601)	39,6 ± 21,2 (24,6 – 54,6)	38,4 ± 41,2 (9,3 – 67,5)	12,4 ± 8,1 (6,7 – 18,1)	0,91 ± 1,29 (ND – 1,82)	0,75 ± 1,07 (ND – 1,51)	2,33 ± 0,78 (1,78 – 2,88)	551 ± 283 (351 – 752)
Multifloral	74	1295 ± 640 (288 – 4376)	78,8 ± 26,3 (35,4 – 155,8)	56,0 ± 46,1 (5,7 – 252,6)	62,2 ± 53,2 (6,8 – 227,8)	7,80 ± 8,15 (ND – 51,66)	0,68 ± 4,32 (ND – 36,31)	1,72 ± 1,14 (ND – 4,18)	1508 ± 696 (349 – 4618)
Multifloral y de mielada	2	1869 ± 451 (1550 – 2187)	96,8 ± 12,7 (87,8 – 105,8)	17,9 ± 4,6 (14,7 – 21,2)	176,6 ± 87,4 (114,8 – 238,4)	19,74 ± 27,92 (ND – 39,48)	ND	0,44 ± 0,62 (ND – 0,87)	2200 ± 603 (1774 – 2626)

Promedio ± SD (Vmin-Vmax)
ND: No detectable

El manganeso se ha cuantificado en todas las muestras de *Castanea sativa* Miller y de *Erica* sp., pero no se ha podido detectar en ninguna de las mieles de *Citrus* sp., *Echium* sp. y *Rosmarinus* sp. y *Trifolium* L. sp. El níquel se ha detectado únicamente en alguna de las muestras de *Eucalyptus* sp., *Rosmarinus* sp., *Trifolium* L. sp. y mieles multiflorales. Por su parte, el litio se ha detectado en todas las muestras de *Castanea sativa* Miller, *Citrus* sp., *Diplotaxis*, sp., *Echium* sp., *Erica* sp., *Rubus*, sp. y de *Trifolium* L. sp.

En esta tabla se puede observar que las muestras de *Castanea sativa* Miller y de *Erica* sp. tienen un alto contenido medio en potasio, y por ello el total de cationes es también el más elevado. Por el contrario, las muestras de *Citrus* sp., *Diplotaxis*, sp. y *Echium* sp., poseen bajo contenido medio en el total de cationes y en potasio.

Las mieles de *Castanea sativa* Miller y *Eucalyptus* sp. presentan alta concentración media de calcio. Por el contrario, el contenido de este catión es bajo en las muestras de *Echium* sp., *Rosmarinus* sp., *Rubus*, sp. y de *Trifolium* L. sp.

Las mieles de *Eucalyptus* sp. muestran alto contenido medio en sodio, las de *Citrus* sp. tienen un bajo contenido medio en magnesio al igual que las muestras de *Trifolium* L. sp. Además, estas últimas poseen bajas cantidades de manganeso, como las muestras de *Rosmarinus* sp. Las mieles de *Eucalyptus* sp. presentan el contenido medio más bajo en níquel.

Finalmente, las dos muestras multiflorales y de mielada se caracterizan por presentar alta concentración de magnesio y manganeso y bajos niveles de litio.

5.3.2.1.2.3 Resultados obtenidos según el origen geográfico del envasador de las muestras de miel

Estos resultados se han agrupado, en primer lugar en función de la comunidad autónoma de origen del envasador y se resumen en la Tabla 5.15.

Tabla 5.15

Contenido en cationes (mg/kg) de las muestras de miel analizadas agrupadas según la comunidad autónoma de procedencia del envasador.

Origen geográfico	n	Potasio	Calcio	Sodio	Magnesio	Manganeso	Níquel	Litio	Total
Castilla La Mancha	7	847 ± 451 (353 – 1644)	64,6 ± 21,3 (42,3 – 100,7)	15,8 ± 10,3 (10,6 – 38,8)	32,4 ± 39,5 (9,1 – 120,4)	0,86 ± 2,28 (ND – 6,02)	1,21 ± 0,94 (ND – 2,52)	ND	962 ± 498 (55 – 1877)
Castilla y León	33	1070 ± 697 (288 – 2678)	74,0 ± 28,2 (13,8 – 155,8)	22,9 ± 18,5 (5,7 – 67,9)	63,3 ± 65,8 (6,7 – 238,4)	7,14 ± 11,00 (ND – 39,48)	1,67 ± 1,19 (ND – 4,97)	1,11 ± 6,32 (ND – 36,31)	1246 ± 794 (41 – 3068)
Comunidad Valenciana	8	995 ± 669 (331 – 2113)	86,0 ± 38,2 (45,0 – 155,2)	51,2 ± 77,3 (6,1 – 239,3)	53,6 ± 49,3 (11,7 – 124,0)	4,00 ± 6,07 (ND – 15,98)	1,69 ± 1,40 (ND – 3,95)	1,29 ± 2,39 (ND – 5,45)	1193 ± 762 (418 – 2389)
Extremadura	2	1704 ± 1123 (910 – 2498)	98,9 ± 19,9 (84,9 – 113,0)	33,5 ± 12,3 (4,8 – 42,1)	114,2 ± 105,1 (39,8 – 188,5)	6,69 ± 9,46 (ND – 13,38)	1,49 ± 0,88 (0,87 – 2,11)	3,56 ± 5,03 (ND – 7,11)	1962 ± 1241 (1085 – 2840)
Galicia	75	1300 ± 817 (496 – 4742)	84,5 ± 27,4 (37,6 – 174,2)	80,3 ± 49,9 (15,2 – 252,6)	50,3 ± 46,8 (15,8 – 209,3)	8,91 ± 6,96 (ND – 51,66)	1,74 ± 1,44 (ND – 6,49)	0,14 ± 0,63 (ND – 4,78)	1534 ± 836 (685 – 4985)

Promedio ± SD (Vmin-Vmax)

ND: No detectable

Al observar esta tabla, destaca el alto contenido medio en potasio, calcio, magnesio y litio que poseen las mieles de Extremadura y el alto contenido medio en sodio, manganeso y níquel que tienen las muestras de Galicia.

Por el contrario, las muestras de Castilla La Mancha presentan la concentración media más baja en todos los cationes.

Si se tiene en cuenta el contenido total en cationes de las muestras analizadas, se podría destacar el alto contenido que presentan las dos mieles de Extremadura.

Las muestras de Galicia han sido clasificadas, en segundo lugar, según la provincia de la que procede su envasador. Los resultados se muestran en la Figura 5.10 en la que se puede observar como las muestras de Ourense contienen altos valores medios de potasio, calcio, magnesio, manganeso y litio y bajo contenido medio en sodio. Por el contrario, las muestras de Lugo presentan el mayor valor medio de sodio y los niveles medios más bajos de litio.

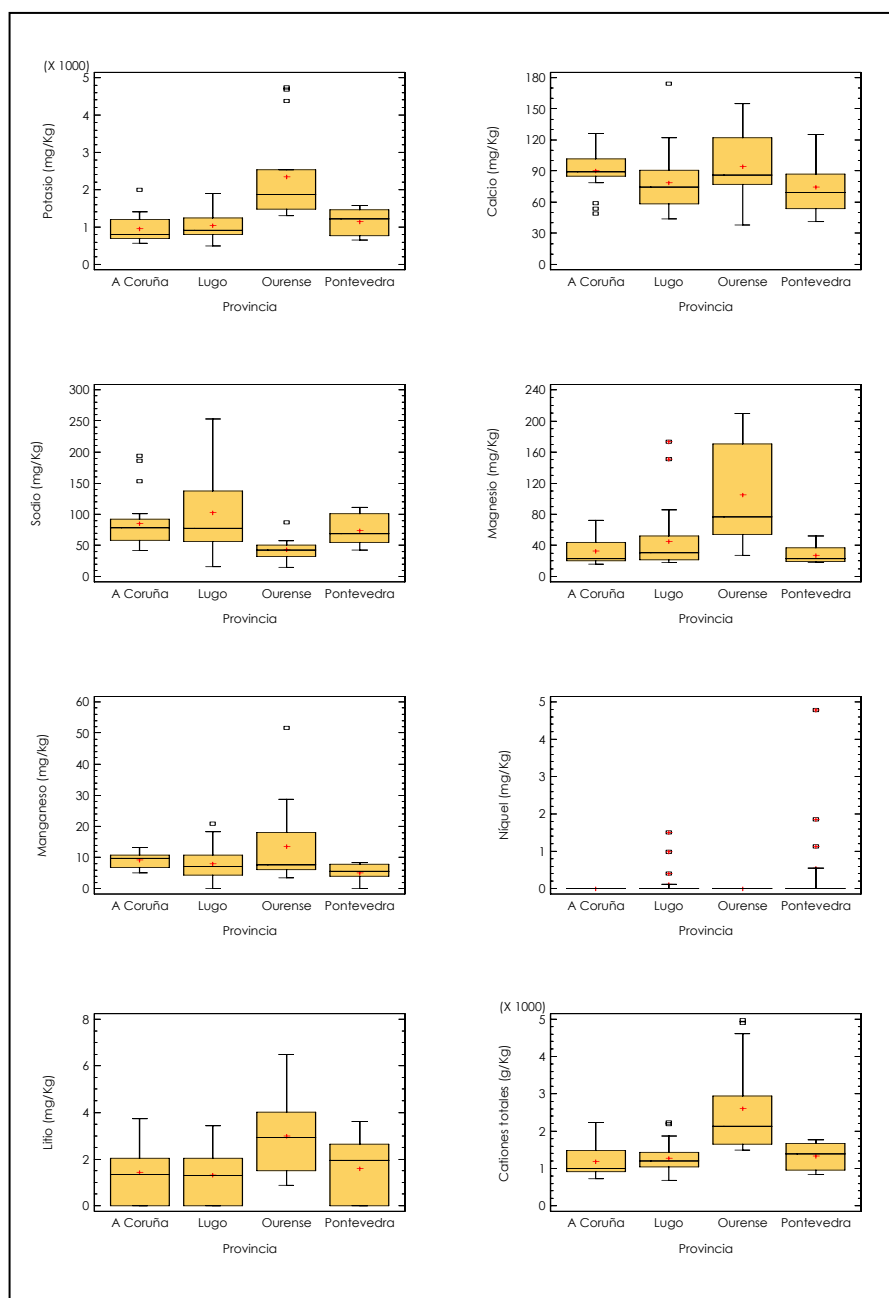


Figura 5.10. Distribución del contenido en cationes (mg/kg) de las muestras gallegas analizadas agrupadas según la provincia de origen del envasador.

Lo más destacable de las muestras de A Coruña es que presentan un bajo contenido medio en potasio. Respecto a las muestras de Pontevedra, se observa que tienen bajo contenido medio en calcio, magnesio y en manganeso aunque poseen alta concentración media en níquel. Este catión no se detecta en las mieles de A Coruña y de Ourense. En relación al contenido total en cationes, cabe destacar que las muestras de Ourense son las que poseen una mayor concentración media total y las de A Coruña el menor contenido medio en cationes.

5.3.2.2 Aplicación de este método en otros tipos de muestras

Este método de determinación de cationes mediante electroforesis capilar fue aplicado en otras matrices entre las que destacan las bebidas y la leche.

5.3.2.2.1 Bebidas

Esta aplicación se describe con detalle en el trabajo *Suárez-Luque et al. (2006a)* en el que se determinan los cationes en muestras de vino blanco, vino tinto, zumo de manzana y melocotón, zumo de piña y uva, zumo de naranja y un refresco de naranja. El único tratamiento previo que se ha llevado a cabo en las muestras ha sido dilución y filtración de las mismas [ANEXO II].

5.3.2.2.2 Leche

El método propuesto también se puso en práctica para la determinación de cationes en muestras de leche. Esta aplicación se desarrolla en el trabajo *Suárez-Luque et al. (2007)* en el que se describe la determinación de potasio, calcio, sodio y magnesio en muestras de leche entera, semidesnatada y desnatada. La preparación de la muestra consiste en una dilución, una acidificación a pH 4,00 con ácido acético 1 M (para extraer los cationes que se encuentran en el interior de las micelas) y una filtración posterior [ANEXO III].

5.4 DETERMINACIÓN DE ANIONES MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

El método de determinación de aniones en muestras de miel mediante electroforesis capilar que se propone en este trabajo ha sido publicado en el *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Suárez-Luque et al., 2006b) [ANEXO IV].

5.4.1 Parte experimental

5.4.1.1 Material y aparatos

Ver apartado 5.3.1.1. Para esta técnica se utilizó el mismo material y aparatos que para la determinación de cationes mediante electroforesis capilar con la salvedad de que, en este caso, se utilizó una fuente de alimentación negativa y un detector UV-Vis de longitud de onda fija con lámpara de mercurio y filtro de 254 nm.

5.4.1.2 Reactivos

Los patrones de los aniones analizados (cloruro, nitrato, sulfato, fosfato y ácido fórmico) y los componentes del electrolito, dicromato potásico y tetraetilenpentamina (TEPA), han sido suministrados por Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

5.4.1.3 Procedimiento de trabajo

5.4.1.3.1 Preparación de las disoluciones patrón

Ver apartado 5.3.1.3.1.

5.4.1.3.2 Preparación de la muestra

Ver apartado 5.3.1.3.2.

5.4.1.3.3 Condiciones electroforéticas

5.4.1.3.3.1 Preparación del electrolito

Se pipetea 10 mL de una solución de dicromato potásico 20 mM y 1 mL de tetraetilenpentamina 5 mM enrasando a 100 mL en un matraz aforado. Se filtra a vacío a través de un filtro de membrana de 0,45 μm y se deja desgasificar la disolución durante unos minutos. Esta solución se prepara diariamente.

5.4.1.3.3.2 Acondicionamiento del capilar

Ver apartado 5.3.1.3.3.2.

5.4.1.3.3.3 Lavado del capilar

Ver apartado 5.3.1.3.3.3.

5.4.1.3.3.4 Condiciones de separación

Estas condiciones se describen en la Tabla 5.16.

Tabla 5.16 Condiciones de separación del método de electroforesis capilar utilizado para la determinación de los aniones en este trabajo.

Inyección	Modo de inyección	Hidrodinámico (elevación 10 cm)
	Tiempo de inyección	10 segundos
Separación	Capilar	60 cm x 75 µm ID
	Temperatura	25°C
	Voltaje	-27 KV
Detección	Modo de detección	UV indirecta
	Longitud de onda	254 nm
	Velocidad de adquisición de datos	20 puntos/segundo
Tiempo de análisis		11 minutos

5.4.2 Resultados y discusión

El método propuesto permite la separación, identificación y cuantificación de los aniones cloruro, nitrato, sulfato, fosfato y ácido fórmico en 11 minutos de análisis.

Uno de los objetivos de este trabajo era la puesta a punto de un método analítico para la determinación de los aniones inorgánicos en la miel. Cuando el método propuesto se aplicó a muestras de miel, se observó un pico en el electroferograma, a unos 7 minutos de análisis, que no se correspondía con ningún anión inorgánico. Por este motivo se investigó la identidad de este anión mediante la adición de soluciones patrón de aniones orgánicos y se concluyó que se trataba del ácido fórmico.

En la Figura 5.11, se pueden observar dos electroferogramas obtenidos al analizar dos muestras de miel con diferente contenido en aniones.

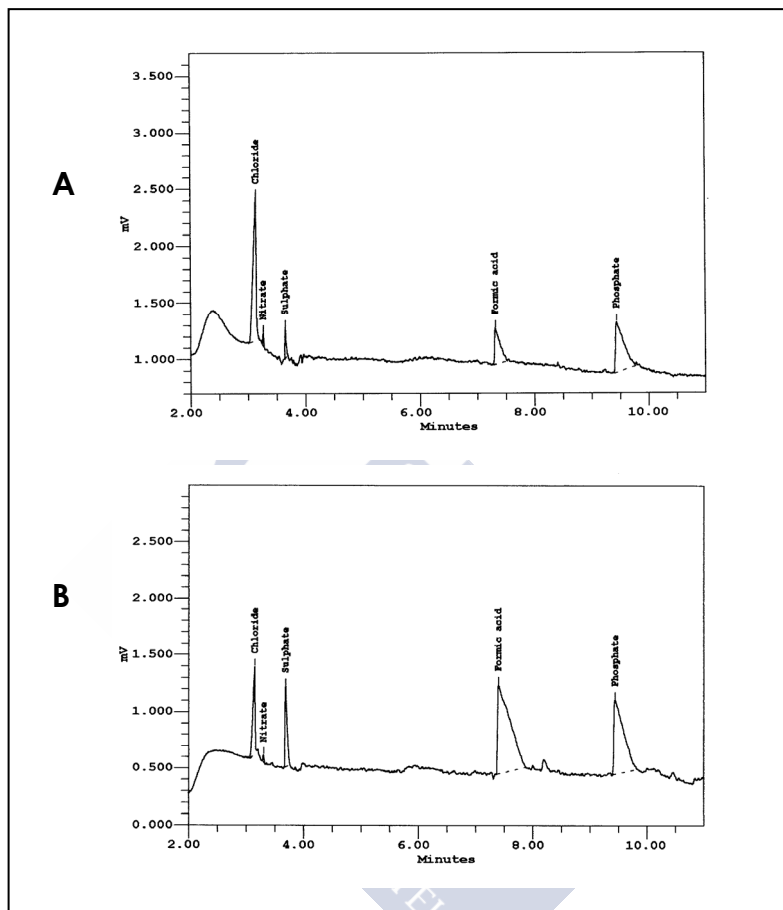


Figura 5.11 Electroferogramas de los aniones determinados mediante el método propuesto en dos muestras de miel, una de *Eucalyptus sp.* (A) y otra de *Castanea sativa* Miller (B).

5.4.2.1 Puesta a punto del método

5.4.2.1.1 Condiciones electroforéticas

5.4.2.1.1.1 Composición del electrolito

Como electrolito y compuesto que absorbe en el UV, se han probado el dicromato y el ftalato. El primero porque es el que aparece con mayor frecuencia en la bibliografía consultada (*Galli et al., 1981*), y el segundo porque tiene una movilidad similar al fosfato por lo que podría acortar el tiempo de análisis.

Se eligió el dicromato como electrolito porque, por una parte, se observó que el ftalato deforma los picos de todos los aniones excepto el del fosfato, los tiempos de análisis son largos (aproximadamente 20 minutos) y la línea base es inestable. Por otra parte, el cromato es un buen cromóforo y permite la separación a valores bajos de pH.

a) Efecto de la concentración de cromato

Se testaron varias concentraciones de cromato en el electrolito y se observó que a mayor concentración del mismo, mayor inestabilidad de la línea base por lo que se seleccionó una concentración de cromato 2 mM.

b) Selección del supresor del flujo electroosmótico

El mayor inconveniente para la determinación de aniones en muestras de miel es que se trata de analitos minoritarios en presencia de una gran cantidad de compuestos orgánicos que pueden alterar el equilibrio químico e interferir en la separación de los aniones. Una posible solución a este problema, es la transformación de todos los analitos a su forma aniónica mediante su disolución en medio ácido y separación mediante una adecuada supresión del flujo electroosmótico. Esta situación requiere un delicado control de este flujo para lograr que los aniones migren en el capilar en dirección opuesta a los cationes y a los compuestos neutros. Para ello, se han utilizado tradicionalmente los tensioactivos catiónicos que invierten el flujo electroosmótico debido a sus efectos sobre la pared capilar. Sin embargo, estos compuestos permiten que este flujo avance en la misma dirección que los aniones y, por lo tanto, puede llevar componentes que causan interferencias. Por el contrario, las alquil aminas son capaces de suprimir el flujo electroosmótico en diferentes grados siendo la tetraetilenpentamina (TEPA) uno de los más eficaces (*Fung y Tung, 2001*). Por estas razones, la TEPA fue seleccionada como supresora del flujo electroosmótico.

Se estudió el efecto de la concentración de TEPA en un rango entre 0,05 y 0,25 mM. Se observó que al aumentar la concentración de TEPA, se aumentaban los tiempos de migración de los aniones y se empobrecía la línea base. Por ello, se seleccionó la concentración 0,05 mM como la óptima teniendo en cuenta el tiempo de análisis, la separación de los aniones y la máxima detección de los mismos.

5.4.2.1.2 Tiempos de migración

Debido a los bajos porcentajes de variación en los tiempos de migración y a que los aniones eluyen separados, no ha sido necesario el cálculo de los tiempos de migración relativos.

5.4.2.1.3 Límites de detección y cuantificación

Estos límites han sido calculados mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.1.1.3.

En la Tabla 5.17, se indican los límites de detección y cuantificación de los aniones estudiados. Los límites de detección obtenidos se encuentran entre 0,03 mg/kg para el nitrato y 20,0 mg/kg para el cloruro. En lo que se refiere a los límites de cuantificación, oscilan entre 1,52 mg/kg para el nitrato y 20,6 mg/kg para el cloruro.

Tabla 5.17

Límites de detección y cuantificación (mg anión/kg miel) y coeficientes de correlación (r) de las rectas de calibrado de los aniones analizados.

Anión	Límite de detección	Límite de cuantificación	r
Cloruro	20,0	20,6	0,9995
Nitrato	0,03	1,52	0,9997
Sulfato	1,3	3,0	0,9995
Fosfato	0,5	5,0	0,9998
Ácido fórmico	2,5	6,6	0,9998

5.4.2.1.4 Curvas de calibrado

Se han construido mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.1.1.4. En la Tabla 5.17 se muestran los coeficientes de correlación de las curvas obtenidas observándose que son lineales en un amplio intervalo de concentraciones, desde el límite de cuantificación hasta, al menos 2,5 g/kg para el cloruro, 0,25 g/kg para el nitrato, 0,75 g/kg en el caso del sulfato, 1,5 g/kg cuando se trata del fosfato y 0,75 g/kg para el ácido fórmico, con coeficientes de correlación de 0,9995 o superiores.

5.4.2.1.5 Precisión

El estudio de precisión se ha llevado a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.1.1.5. La Tabla 5.18 muestra los resultados obtenidos en porcentaje de desviación estándar relativa (RSD%).

Estos resultados son iguales o menores a 1,4% para los tiempos de migración y de 1,8% o menores para el contenido en aniones (mg/kg) en el estudio de repetibilidad. En el estudio de reproducibilidad los porcentajes de desviación estándar relativa son iguales o menores a 2,4% para los tiempos de migración e iguales o menores a 4,3% para el contenido en aniones.

Tabla 5.18 Resultados de precisión (RSD%) del método propuesto.

Anión	Muestra 1		Muestra 2	
	Tiempo de migración	Concentración	Tiempo de migración	Concentración
Repetibilidad (n=5)				
Cloruro	0,1	1,8	0,3	0,3
Nitrato	0,1	1,6	0,3	0,8
Sulfato	0,5	1,2	0,7	0,2
Fosfato	0,3	1,4	0,8	0,3
Ácido fórmico	1,4	1,2	1,2	0,4
Reproducibilidad (n=3)				
Cloruro	0,5	3,5	0,4	0,3
Nitrato	0,6	1,9	0,4	1,9
Sulfato	1,4	1,5	1,3	0,3
Fosfato	2,4	1,8	1,1	0,3
Ácido fórmico	1,9	4,3	0,5	0,4

Se realizó un análisis de la varianza para determinar si las diferencias entre las repeticiones (cinco en el caso de la repetibilidad y tres para la reproducibilidad) son estadísticamente significativas. Se obtuvieron valores de p mayores de 0,05 de manera que se concluye que las diferencias no son estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95%, por lo que el método estudiado es preciso para la determinación de aniones en muestras de miel.

5.4.2.1.6 Exactitud

El estudio de exactitud se realizó como se indica en el apartado 5.3.2.1.1.6. En la Tabla 5.19 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para cada anión y los valores de p obtenidos al estudiar el efecto matriz. En todos los casos se obtuvieron valores de p mayores de 0,05, por lo que se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de las líneas de regresión a un nivel de confianza del 95%, de manera que no existe efecto matriz para la determinación de aniones en muestras de miel mediante el método propuesto.

Tabla 5.19

Recuperaciones obtenidas mediante el método de las adiciones estándar para los aniones analizados y valores de p del estudio de comparación de las pendientes de las rectas de regresión obtenidas al estudiar el efecto matriz.

Anión	Recuperación (%) \pm SD	p -valor
Cloruro	94,4 \pm 9,6	0,9935
Nitrato	97,1 \pm 3,1	0,2422
Sulfato	98,8 \pm 1,2	0,8692
Fosfato	99,8 \pm 0,4	0,1285
Ácido fórmico	97,4 \pm 2,8	0,7003

5.4.2.2 Contenido en aniones de las muestras de miel

En la Tabla 5.20 y en la Figura 5.12 se muestran los valores y la distribución del contenido de cada anión en las 125 muestras analizadas.

Tabla 5.20 Contenido de los aniones (mg/kg) obtenido para el total de las muestras de miel analizadas.

Anión	Promedio \pm SD	Vmín-Vmáx
Cloruro	213 \pm 147	25-977
Nitrato	3,17 \pm 3,14	ND-18,96
Sulfato	48,8 \pm 51,5	3,9-284,4
Fosfato	193 \pm 172	32-1495
Ácido fórmico	81,1 \pm 99,0	ND-693,4
Total aniones inorgánicos	458 \pm 272	126-2767

ND: No detectable

En el caso del nitrato y del ácido fórmico, es importante indicar que existen muestras cuyo contenido se encuentra por debajo del límite de detección o de cuantificación del método propuesto. En el caso del límite de detección, 10 muestras de miel se encuentran por debajo de este límite para el nitrato y 2 muestras en relación al ácido fórmico. Por otra parte, el contenido en nitrato y ácido fórmico se encuentra por debajo del límite de cuantificación en 28 y 3 mieles, respectivamente.

Al observar las gráficas se aprecia que todos los aniones muestran una distribución asimétrica con la mayor parte de las muestras en la parte izquierda.

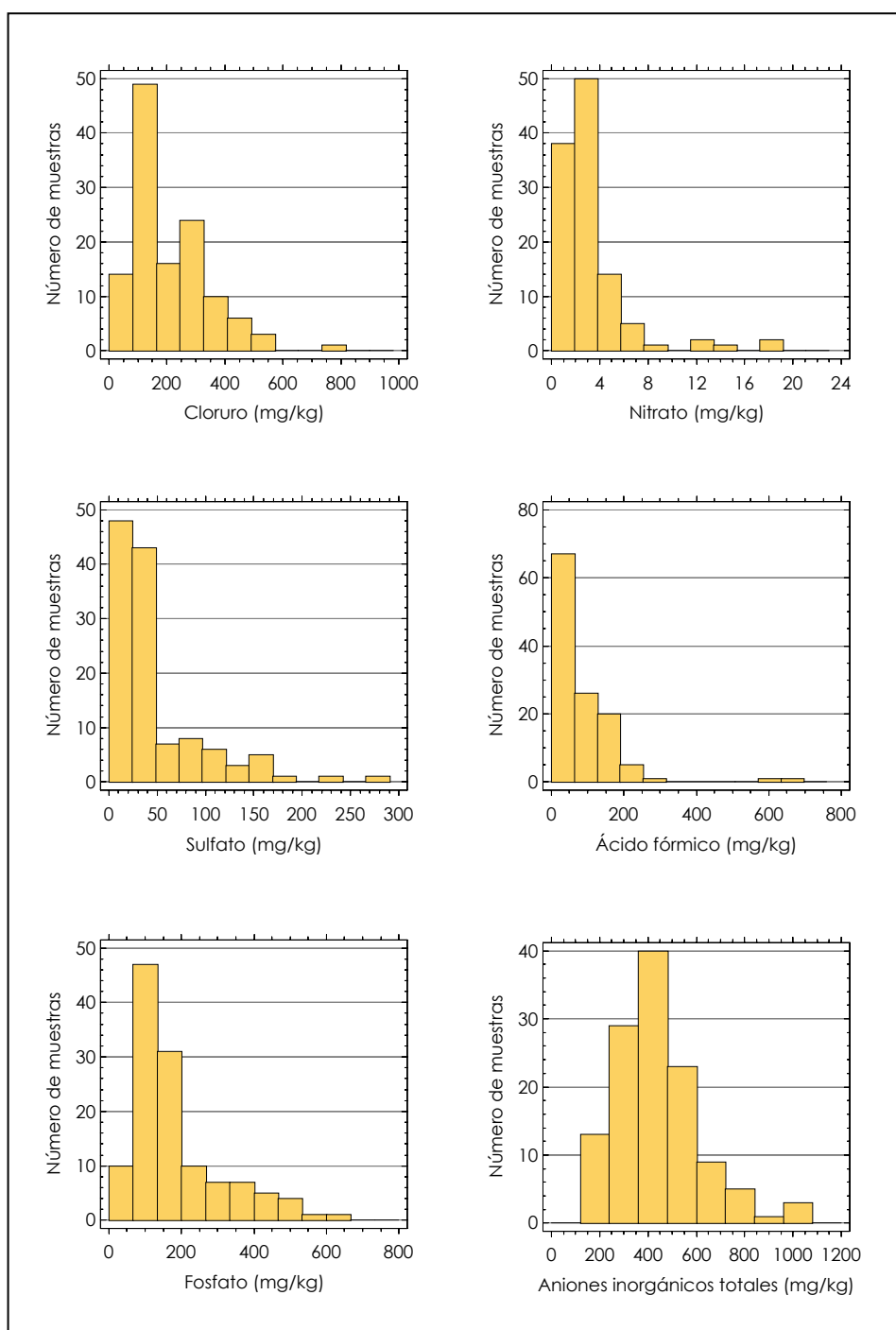


Figura 5.12. Distribuciones del contenido de los aniones determinados en las mieles analizadas.

5.4.2.2.1 Comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los publicados por otros autores

En la Tabla 5.21 se muestran los contenidos de aniones en muestras de miel obtenidos por otros autores y clasificadas según su país de origen.

Tabla 5.21

Contenido en aniones de las mieles analizadas por otros autores y clasificadas según su país de origen. Se muestran los contenidos mínimo y máximo en mg/kg.

País	Autores	n	Cloruro	Nitrato	Sulfato	Fosfato
Arabia Saudí	Al-Khalifa y Al-Arify (1999)	10	-	-	-	28 - 521
Eslovenia	Golob et al. (2005)	79	4 - 560	-	111-1320	216 - 365
España	9 Referencias ^[1]	362	43 - 833	0,5 - 7,3	0 - 243	13 - 1079
Francia	Devillers et al. (2002)	86	-	-	6 - 354	98 - 1220
Israel	Merin et al. (1998); Dag et al. (2006)	419	-	-	67 - 565	144 - 1996
Italia	Poiana et al. (1996); Conti et al. (2007)	128	29 - 634	4 - 101	13 - 262	15 - 208
Venezuela	De Ferrer et al. (2004)	30	-	-	-	1304-2274

^[1] Referencias de España: (Pérez-Cerrada et al., 1989; Rodríguez-Otero et al., 1995; Del Nozal et al., 2000; González-Paramás et al., 2000; Terrab et al., 2004a; Terrab et al., 2004b; Fernández-Torres et al., 2005; González-Miret et al., 2005; Terrab et al., 2005)

- En la siguientes referencias, se ha convertido el azufre en sulfato y el fósforo en fosfato para tener resultados comparables: (Pérez-Cerrada et al., 1989; Rodríguez-Otero et al., 1995; Merin et al., 1998; Al-Khalifa y Al-Arify, 1999; Devillers et al., 2002; Terrab et al., 2004a; Terrab et al., 2004b; Fernández-Torres et al., 2005; Golob et al., 2005; González-Miret et al., 2005; Terrab et al., 2005)

El contenido en cloruro, nitrato y sulfato obtenido en la mayor parte de las muestras analizadas en este trabajo es perfectamente comparable con los contenidos obtenidos en la bibliografía consultada tanto en el caso de mieles españolas como de otros países, exceptuando el elevado contenido en sulfato encontrado en las muestras de Eslovenia y el elevado nivel en nitrato observado en algunas muestras italianas.

En relación al fosfato, el contenido obtenido en las mieles analizadas es este trabajo es similar al obtenido por otros autores en muestras procedentes de España e incluso de Francia e Israel. Sin embargo, en las muestras italianas se obtienen niveles más bajos y en las muestras de Venezuela el contenido en fosfato es superior al observado en las muestras procedentes de otros países.

En cuanto al ácido fórmico, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los encontrados en la bibliografía consultada (Talpay, 1989; Del

Nozal et al., 1998; Alamanni et al., 2000; Bogdanov et al., 2002; Del Nozal et al., 2003; Mato et al., 2006).

5.4.2.2 Resultados obtenidos según el origen botánico de las muestras

En la Tabla 5.22 se muestran los resultados obtenidos en las muestras analizadas agrupados según el origen botánico de las mismas.

Tabla 5.22

Contenido en aniones (mg/kg) de las muestras de miel analizadas agrupadas según su origen botánico.

Origen botánico	n	Cloruro	Nitrato	Sulfato	Fosfato	Ácido fórmico	Total aniones inorgánicos
<i>Castanea sativa</i> Miller	4	113 ± 74 (57 – 219)	3,89 ± 3,46 (1,52 – 9,03)	123,7 ± 46,5 (74,7 – 173,2)	307 ± 183 (112 – 506)	293,4 ± 226,8 (126,9 – 628,2)	547 ± 166 (382 – 715)
<i>Citrus</i> sp.	2	73 ± 16 (62 – 84)	3,61 ± 1,68 (2,43 – 4,80)	23,5 ± 13,0 (14,3 – 32,7)	84 ± 2 (83 – 86)	22,9 ± 3,3 (20,5 – 25,2)	184 ± 32 (162 – 207)
<i>Diplotaxis</i> sp.	1	193	4,38	32,7	107	39,2	338
<i>Echium</i> sp.	1	123	1,52	8,5	154	13,8	286
<i>Erica</i> sp.	2	96 ± 32 (73 – 118)	2,05 ± 0,56 (1,65 – 2,45)	67,1 ± 36,6 (41,3 – 93,0)	296 ± 84 (236 – 355)	151,6 ± 6,0 (147,3 – 155,8)	460 ± 88 (398 – 523)
<i>Eucalyptus</i> sp.	25	388 ± 116 (250 – 801)	3,43 ± 2,76 (1,52 – 14,86)	26,6 ± 52,0 (6,6 – 273,4)	90 ± 74 (32 – 414)	34,1 ± 12,3 (16,9 – 64,8)	508 ± 176 (338 – 1063)
<i>Lavandula</i> sp.	4	305 ± 449 (57 – 977)	4,25 ± 4,84 (ND – 10,94)	108,4 ± 126,4 (15,4 – 284,4)	534 ± 646 (141 – 1495)	127,6 ± 164,5 (ND – 369,1)	951 ± 1219 (216 – 2767)
<i>Rosmarinus</i> sp.	6	84 ± 27 (41 – 119)	1,41 ± 2,21 (ND – 4,71)	23,1 ± 15,8 (3,9 – 45,1)	132 ± 51 (88 – 231)	27,7 ± 19,7 (9,6 – 64,2)	240 ± 82 (136 – 371)
<i>Rosmarinus</i> y <i>Trifolium</i> sp.	1	58	2,92	99,3	333	37,6	493
<i>Rubus</i> sp	1	312	3,30	33,7	107	190,0	456
<i>Trifolium</i> L. sp.	2	97 ± 49 (63 – 132)	0,86 ± 1,22 (ND – 1,72)	8,8 ± 5,1 (5,2 – 12,4)	115 ± 42 (85 – 145)	8,9 ± 3,2 (6,6 – 11,2)	222 ± 98 (153 – 291)
Multifloral	74	179 ± 87 (38 – 447)	3,22 ± 3,42 (ND – 18,96)	50,4 ± 42,1 (6,4 – 229,1)	204 ± 123 (48 – 626)	89,4 ± 95,1 (ND – 693,4)	437 ± 165 (188 – 971)
Multifloral y de mielada	2	117 ± 131 (25 – 210)	3,04 ± 2,15 (1,52 – 4,56)	134,0 ± 17,9 (121,3 – 146,7)	474 ± 18 (461 – 487)	83,2 ± 18,5 (70,2 – 96,3)	728 ± 98 (659 – 797)

Promedio ± SD (V_{min}-V_{máx})

ND: No detectable

En esta tabla se puede observar que las muestras de *Eucalyptus* sp., *Lavandula* sp. y *Rubus*, sp. poseen un alto contenido en cloruro mientras que las muestras de *Citrus* sp. y la muestra de *Rosmarinus* y *Trifolium* sp. tienen bajos niveles del mismo.

En el caso del nitrato, las muestras de *Lavandula* sp. y la muestra de *Diplotaxis*, sp. poseen un alto valor medio, mientras que las muestras de *Trifolium* L. sp. muestran un bajo contenido de nitrato.

Para el sulfato se tiene un contenido muy variable en la mayoría de los espectros polínicos. Se podría destacar los bajos niveles en este anión que presentan las muestras de *Echium* sp. y *Trifolium* L. sp. y los altos niveles que muestran las dos mieles mezcla de multifloral y de mielada.

En cuanto al fosfato se podría destacar la elevada dispersión en el contenido que presentan las mieles de *Lavandula* sp. y el bajo contenido medio del mismo en las muestras de *Citrus*, sp y *Eucalyptus* sp.

Respecto al ácido fórmico cabe indicar que las muestras de *Castanea sativa* Miller poseen un alto contenido medio del mismo y las muestras de *Echium* sp. y *Trifolium* L. sp. presentan un contenido muy bajo.

Por último, si se observa el contenido total en aniones inorgánicos de las muestras analizadas, destaca el alto contenido medio en aniones inorgánicos de las muestras de *Lavandula* sp. y el bajo contenido medio de las muestras de *Citrus*, sp y *Trifolium* L. sp.

5.4.2.2.3 Resultados obtenidos según el origen geográfico del envasador de las muestras de miel

Estos resultados se han agrupado, en primer lugar en función de la comunidad autónoma de origen del envasador y se resumen en la Tabla 5.23.

Tabla 5.23

Contenido en aniones (mg/kg) de las muestras de miel analizadas agrupadas según la comunidad autónoma de procedencia del envasador.

Origen geográfico	n	Cloruro	Nitrato	Sulfato	Fosfato	Ácido fórmico	Total aniones inorgánicos
Castilla La Mancha	7	208 ± 341 (41 – 977)	2,41 ± 3,91 (ND – 10,94)	66,6 ± 101,1 (6,8 – 284,4)	366 ± 505 (88 – 1495)	84,3 ± 127,5 (13,8 – 369,1)	642 ± 944 (136 – 2767)
Castilla y León	33	142 ± 88 (25 – 433)	2,82 ± 3,35 (ND – 18,96)	55,7 ± 54,7 (3,9 – 229,1)	229 ± 142 (83 – 626)	53,2 ± 48,9 (ND – 165,1)	430 ± 192 (153 – 971)
Comunidad Valenciana	8	232 ± 249 (82 – 801)	6,50 ± 3,57 (3,77 – 14,86)	92,7 ± 86,4 (32,7 – 273,4)	225 ± 154 (86 – 461)	49,5 ± 31,9 (20,4 – 114,6)	557 ± 362 (207 – 1063)
Extremadura	2	259 ± 73 (207 – 311)	7,43 ± 8,01 (1,77 – 13,10)	89,6 ± 72,1 (38,6 – 140,6)	470 ± 152 (363 – 578)	92,6 ± 50,8 (56,7 – 128,5)	826 ± 143 (725 – 927)
Galicia	75	241 ± 121 (38 – 531)	2,93 ± 2,55 (ND – 18,82)	38,4 ± 33,7 (6,6 – 173,2)	151 ± 102 (32 – 506)	96,1 ± 115,1 (6,6 – 693,4)	433 ± 119 (188 – 817)

Promedio ± SD (V_{mín}-V_{máx})

De esta tabla se podría destacar que la Comunidad Valenciana y Extremadura poseen alto contenido medio en nitrato y Galicia bajo contenido medio en fosfato.

Las muestras de Galicia han sido clasificadas, en segundo lugar, según la provincia de origen del envasador. Los resultados se muestran en la Figura 5.13.

En esta figura se pueden observar altos contenidos medios en las mieles de Ourense para todos los aniones excepto en el caso del cloruro, cuyo valor medio más elevado se presenta en las mieles de A Coruña. Curiosamente el valor promedio de concentración de cloruro en las mieles de Ourense es el más bajo de las muestras analizadas.

Las mieles de Lugo muestran el valor promedio más bajo en nitrato y en contenido total de aniones inorgánicos. Cabe destacar la baja concentración media de sulfato y fosfato que poseen las muestras de Pontevedra. Finalmente, las mieles de A Coruña presentan el contenido medio más bajo en ácido fórmico.

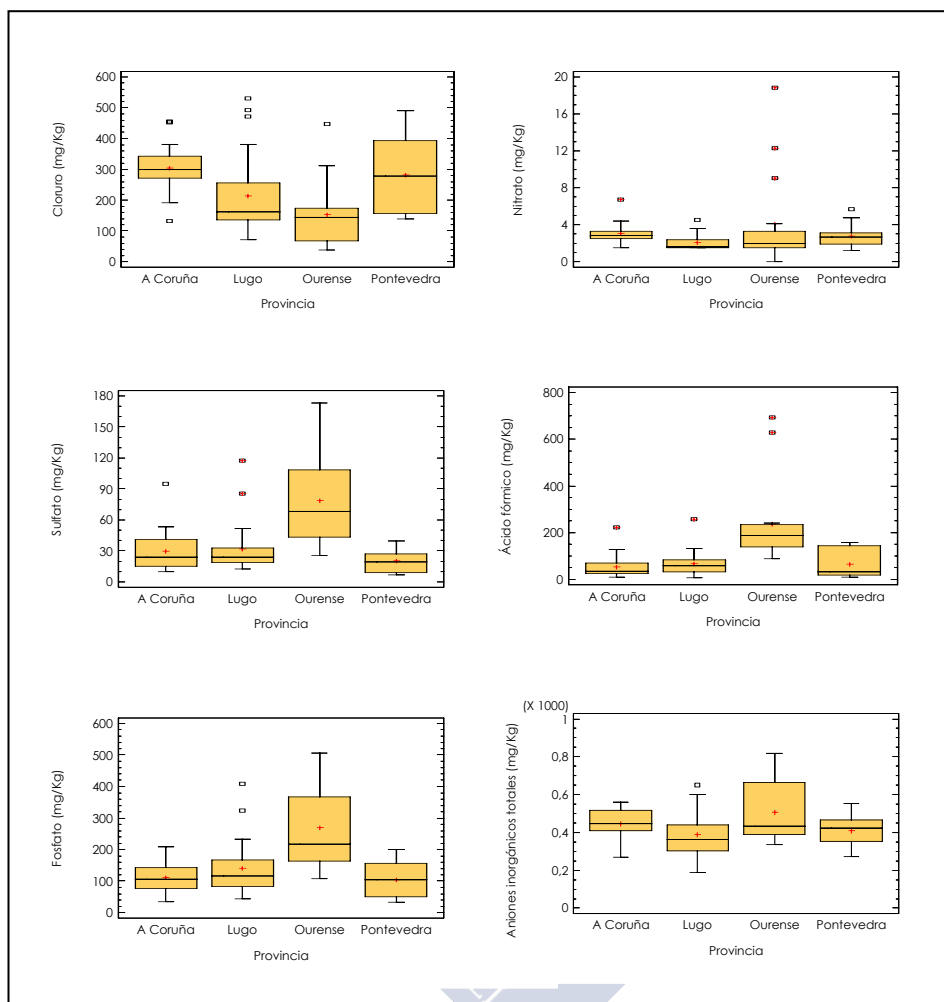


Figura 5.13 Contenido en aniones (mg/kg) de las muestras gallegas analizadas agrupadas según la provincia de origen del envasador.

5.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Tarboush, H. M.; Al-Kahtani, H. A.; El-Sarrage, M. S. Floral-type identification and quality evaluation of some honey types. *Food Chemistry*. **1993**, 46, 13-17.
- ACS. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical Chemistry*. **1980**, 52, 2242-2249.
- Afik, O.; Dag, A.; Kerem, Z.; Shafir, S. Analyses of avocado (*Persea americana*) nectar properties and their perception by honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology*. **2006**, 32(9), 1949-1963.
- Ajtóny, Z.; Bencs, L.; Haraszi, R.; Szigeti, J.; Szoboszlai, N. Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*. **2007**, 71(2), 683-690.
- Alamanni, M. C.; Cossu, M.; Sanna, F.; Un metodo HPLC per il dosaggio degli acidi ossalico, lattico e formico quali acaricidi componenti naturali nel miele. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione*. **2000**, 29, 139-147.
- Al-Khalifa, A. S.; Al-Arif, I. A. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Saudi honeys. *Food Chemistry*. **1999**, 67, 21-25.
- Andrade, P.; Ferreres, F.; Gil, M. I.; Tomás-Barberán, F. A. Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*. **1997**, 60(1), 79-84.
- Arráez-Román, D.; Gómez-Caravaca, A. M.; Gómez-Romero, M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2006**, 41(5), 1648-1656.

- Arvanitoyannis, I. S.; Chalhoub, C.; Gotsiou, P.; Lydakis-Simantiris, N.; Kefalas, P. Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2005**, 45(3), 193-203.
- Azeredo, M.; Da Cunha, L.; De Castro, J. Determination of potassium in honey after precipitation with sodium tetraphenylborate and separation on ion exchanger column. *Quimica Nova*. **1998**, 21(5), 651-654.
- Bagci, Y.; Arslan, D.; Ozcan, M. M.; Dursun, N. Determination of the mineral content of bee honeys produced in Middle Anatolia. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **2007**, 58(7), 567-575.
- Barisic, D.; Vertacnik, A.; Bromenshenk, J. J.; Kezic, N.; Lulic, S.; Hus, M.; Kraljevic, P.; Simpraga, M.; Seletkovic, Z. Radionuclides and selected elements in soil and honey from Gorski Kotar, Croatia. *Apidologie*. **1999**, 30(4), 277-287.
- Baroni, M. V.; Arrua, C.; Nores, M. L.; Fayé, P.; Díaz, M. P.; Chiabrando, G. A.; Wunderlin, D. A. Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. *Food Chemistry*. **2009**, 114(2), 727-733.
- Basa, A.; Magnuszewska, J.; Krogulec, T.; Baranski, A. S. Cyclic chronopotentiometric determination of sugars at Au and Pt microelectrodes in flowing solutions. *Journal of Chromatography A*. **2007**, 1150(1-2), 312-319.
- Bogdanov, S.; Charrière, J. D.; Imdorf, A.; Kilchenmann, V.; Fluri, P. Determination of residues in honey after treatments with formic and oxalic acid under field conditions. *Apidologie*. **2002**, 33(4), 399-409.
- Bogdanov, S.; Haldimann, M.; Luginbuhl, W.; Gallmann, P. Minerals in honey: Environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research*. **2007**, 46(4), 269-275.

- Camilleri, P. History and development of capillary electrophoresis. En *Capillary electrophoresis. Theory and practice*, 2nd ed.; CRC-Press: Florida. USA., **1998**, pp 1-22.
- Caroli, S.; Forte, G.; Lamiceli, A. L.; Galoppi, B. Determination of essential and potentially toxic trace elements in honey by inductively coupled plasma-based techniques. *Talanta*. **1999**, 50, 327-336.
- Casado-Terrones, S.; Segura-Carretero, A.; Busi, S.; Dinelli, G.; Fernández-Gutiérrez, A. Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection. *Electrophoresis*. **2007**, 28(16), 2882-2887.
- Conti, M. E. Lazio region (central Italy) honeys: A survey of mineral content and typical quality parameters. *Food Control*. **2000**, 11, 459-463.
- Conti, M. E.; Stripeikis, J.; Campanella, L.; Cucina, D.; Tudino, M. B. Characterization of Italian honeys (Marche Region) on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. *Chemistry Central Journal*. **2007**, 1, 1-14.
- Cruces, C. *Electroforesis capilar*. Servicio de Publicaciones. Universidad de Almería: Almería. España, **1998**.
- Chen, T. B.; Deng, W. H.; Lu, W. H.; Chen, R. M.; Rao, P. F. Detection of residual antibiotics in honey with capillary electrophoresis. *Chinese Journal of Chromatography*. **2001**, 19(1), 91-93.
- Dag, A.; Afik, O.; Yeselson, Y.; Schaffer, A.; Shafir, S. Physical, chemical and palynological characterization of avocado (*Persea americana* Mill.) honey in Israel. *International Journal of Food Science and Technology*. **2006**, 41(4), 387-394.
- De Ferrer, B. S.; De Rodríguez, G. O.; Peña, J.; Martínez, J.; Morán, M. Mineral content of the honey produced in Zulia state. Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. **2004**, 54(3), 346-348.

- Del Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Marinero, P.; Diego, J. C.; Frechilla, J. I.; Higes, M. High performance liquid chromatographic determination of organic acids in honeys from different botanical origin. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. **1998**, 21(20), 3197-3214.
- Del Nozal, M. Z. A.; Bernal, J. L.; Diego, J. C.; Gómez, L. A.; Ruiz, J. M.; Higes, M. Determination of oxalate, sulfate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2000**, 881(1-2), 629-638.
- Del Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Diego, J. C.; Gómez, L. A.; Higes, M. HPLC determination of low molecular weight organic acids in honey with series-coupled ion-exclusion columns. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. **2003**, 26, 1231-1253.
- Delgado, C.; Tomás-Barberán, F. A.; Talou, T.; Gaset, A. Capillary electrophoresis as an alternative to HPLC for determination of honey flavonoids. *Chromatographia*. **1994**, 38(1-2), 71-78.
- Devillers, J.; Dore, J. C.; Marengo, M.; Poirier-Duchene, F.; Galand, N.; Viel, C. Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honeys sold in France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50(21), 5998-6007.
- Devillers, J.; Morlot, M.; Pham-Delegue, M. H.; Dore, J. C. Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry*. **2004**, 86(2), 305-312.
- Díez, M. J.; Andrés, C.; Terrab, A. Physicochemical parameters and pollen analysis of Moroccan honeydew honeys. *International Journal of Food Science and Technology*. **2004**, 39(2), 167-176.
- Dos Santos, J. S.; Dos Santos, N. S.; Dos Santos, M. L. P.; Dos Santos, S. N.; Lacerda, J. J. D. J. Honey classification from semi-arid, atlantic and transitional forest zones in Bahia, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2008**, 19(3), 502-508.

- Downey, G.; Hussey, K.; Daniel Kelly, J.; Walshe, T. F.; Martin, P. G. Preliminary contribution to the characterisation of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. *Food Chemistry*. **2005**, 91(2), 347-354.
- Ehrhardt, P.; Liebig, J. Inorganic constituents of the honey-dew of *Megoura vicia*. *Experientia*. **1965**, 21 (8), 472-473.
- Enrich, C.; Boeykens, S.; Caracciolo, N.; Custo, G.; Vázquez, C. Honey characterization by total reflection X-ray fluorescence: Evaluation of environmental quality and risk for the human health. *X-Ray Spectrometry*. **2007**, 36(4), 215-220.
- Erbilir, F.; Erdogru, O. Determination of heavy metals in honey in Kahramanmaraş city, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*. **2005**, 109, 181-187.
- Fernández-Torres, R.; Pérez-Bernal, J. L.; Bello-López, M. A.; Callejón-Mochón, M.; Jiménez-Sánchez, J. C.; Guiraum-Pérez, A. Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta*. **2005**, 65(3), 686-691.
- François, C.; Morin, P.; Dreux, M. Separation of transition metal cations by capillary electrophoresis optimization of complexing agent concentrations (lactic acid and 18-crown-6). *Journal of Chromatography A*. **1995**, 717(1-2), 303-408.
- Franchini, R. A. D. A.; De Souza, C. F.; Colombara, R.; Matos, M. A. C.; Matos, R. C. Rapid determination of hydrogen peroxide using peroxidase immobilized on amberlite IRA-743 and minerals in honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55(17), 6885-6890.
- Fredes, C.; Montenegro, G. Contenido de metales pesados y otros elementos traza en mieles de abeja en Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*. **2006**, 33(1), 57-66.
- Fung, Y.-S.; Tung, H.-S. Application of capillary electrophoresis for organic acid analysis in herbal studies. *Electrophoresis*. **2001**, 22, 2242-2250.

- 📖 Galli, V.; García, A.; Saavedra, L.; Barbas, C. Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples. *Electrophoresis*. **1981**, 24, 1951-1981.
- 📖 Golob, T.; Dobersek, U.; Kump, P.; Necemer, M. Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*. **2005**, 91, 593-600.
- 📖 Gómez-Caravaca, A. M.; Gómez-Romero, M.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2006a**, 41(4), 1220-1234.
- 📖 Gómez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Problems of quantitative and qualitative estimation of polyphenols in honey by capillary electrophoresis with UV-Vis detection. *Agro Food Industry Hi-Tech*. **2006b**, 17(4), 68-71.
- 📖 González-Miret, M. L.; Terrab, A.; Hernanz, D.; Fernández-Recamales, M. A.; Heredia, F. J. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53(7), 2574-2580.
- 📖 González-Paramás, A. M.; Bárez, J. A. G.; García-Villanova, R. J.; Pala, T. R.; Albajar, R. A.; Sánchez, J. S. Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, 80(1), 157-165.
- 📖 Gordon, M. J.; Huang, X.; Pentoney, S. L., Jr.; Zare, R. N. Capillary electrophoresis. *Capillary Electrophoresis Science*. **1988**, 242, 224-228.
- 📖 Green, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*. **1996**, 68, 305A-309A.

- Heiger, D. N. *High Performance Capillary Electrophoresis - An Introduction*. 2nd edition ed.; Hewlett Packard Company: France, **1992**.
- Hernández, O. M.; Fraga, J. M. G.; Jiménez, A. I.; Jiménez, F.; Arias, J. J. Characterization of honey from the Canary Islands: Determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. *Food Chemistry*. **2005**, 93(3), 449-458.
- Ioannidou, M. D.; Zachariadis, G. A.; Anthemidis, A. N.; Stratis, J. A. Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*. **2005**, 65, 92-97.
- Jenke, D. R. Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. II. Guidelines form primary validation parameters. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. **1996**, 19(5), 737-757.
- Ji, X.; He, Z.; Pang, D. On-line chemical generation of tris(2,2-bipyridyl) ruthenium (III) and its application in CE with chemiluminescence detection. *Electrophoresis*. **2007**, 28(18), 3260-3267.
- Jones, W. R. Method development approaches for capillary ion electrophoresis. *Journal of Chromatography*. **1993**, 640, 387-395.
- Juszczak, L.; Socha, R.; Roznowski, J.; Fortuna, T.; Nalepka, K. Physicochemical properties and quality parameters of herbhoney. *Food Chemistry*. **2009**, 113(2), 538-542.
- Khan, M. N.; Qaiser, M.; Raza, S. M.; Rehman, M. Physicochemical properties and pollen spectrum of imported and local samples of blossom honey from the Pakistani market. *International Journal of Food Science and Technology*. **2006**, 41(7), 775-781.
- Kucuk, M.; Kolayli, S.; Karaoglu, S.; Ulusoy, E.; Baltaci, C.; Candan, F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*. **2007**, 100(2), 526-534.

- 📖 Kump, P.; Necemer, M.; Snajder, J. Determination of trace elements in bee honey, pollen and tissue by total reflection and radioisotope X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*. **1996**, 51, 499-507.
- 📖 Lachman, J.; Koliňova, D.; Miholova, D.; Kosata, J.; Titera, D.; Kult, K. Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. *Food Chemistry*. **2007**, 101(3), 973-979.
- 📖 Latorre, M. J.; Peña, R.; Pita, C.; Botana, A.; García, S.; Herrero, C. Chemometric classification of honeys according to their type. II. Metal content data. *Food Chemistry*. **1999**, 66, 263-268.
- 📖 Latorre, M. J.; Peña, R.; García, S.; Herrero, C. Authentication of Galician (N.W. Spain) honeys by multivariate techniques based on metal content data. *The Analyst*. **2000**, 125, 307-312.
- 📖 Lee, Y.-H.; Lin, T.-I. Determination of metal cations by capillary electrophoresis effect of background carrier and complexing agents. *Journal of Chromatography A*. **1994**, 675(1-2), 227-236.
- 📖 Li, S. F. Y. *Capillary Electrophoresis. Principles, practice and applications*. Elsevier Science Publishers, B. V.: Amsterdam. The Netherlands, **1992**, Vol. 52, pp 4-53.
- 📖 Lin, T.-I.; Lee, Y.-H.; Chen, Y.-C. Capillary electrophoretic analysis of inorganic cations: Role of complexing agent and buffer pH. *Journal of Chromatography A*. **1993**, 654(1), 167-176.
- 📖 López-García, I.; Viñas, P.; Blanco, C.; Hernández-Córdoba, M. Fast determination of calcium, magnesium and zinc in honey using continuous flow flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*. **1999**, 49, 597-602.
- 📖 Ma, M.; Zhang, H. S.; Xiao, L. Y.; Xiao, L.; Wang, P.; Cui, H. R.; Wang, H. Quaternary ammonium chitosan derivative dynamic coating for the separation of

- veterinary sulfonamide residues by CE with field-amplified sample injection. *Electrophoresis*. **2007**, 28(22), 4091-4100.
- ☞ Madejczyk, M.; Baralkiewicz, D. Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. *Analytica Chimica Acta*. **2008**, 617(1-2), 11-17.
- ☞ Matei, N.; Birghila, S.; Dobrinas, S.; Capotab, P. Determination of C vitamin and some essential trace elements (Ni, Mn, Fe, Cr) in bee products. *Acta Chimica Slovenica*. **2004**, 51, 169-175.
- ☞ Mato, I.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J.; Sancho, M. T. Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54(5), 1541-1550.
- ☞ Mendes, T. M. F. F.; Nivaldo Baccan, S.; Cadore, S. Sample treatment procedures for the determination of mineral constituents in honey by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2006**, 17(1), 168-176.
- ☞ Méndez, R. 50 grandes ciudades españolas superan los límites legales de contaminación del aire. <http://www.elpais.com/articulo/sociedad/grandes/ciudades/espanolas/superan/limites/legales/contaminacion/aire/elpepusoc/20070708elp episoc_1/Tes> [consulta: 15 marzo 2009].
- ☞ Merin, U.; Bernstein, S.; Rosenthal, I. A parameter for quality of honey. *Food Chemistry*. **1998**, 63, 241-242.
- ☞ Miller, D. M.; Rutzke, M. A. Las espectroscopías de absorción y de emisión atómica. En *Análisis de los alimentos*, Suzanne Nielsen, S., Ed. Editorial Acribia, S. A.: Zaragoza, **2003**, pp 470-492.
- ☞ Miller, J. N.; Miller, J. C. *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4ª Edición ed.; Pearson Education, S.A.: Madrid, **2002**.

- Montenegro, G.; Fredes, C. Relación entre el origen floral y el perfil de elementos minerales en mieles chilenas. *Gayana Botánica*. **2008**, 65(1), 123-126.
- Nanda, V.; Sarkar, B. C.; Sharma, H. K.; Bawa, A. S. Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2003**, 16(5), 613-619.
- Navarrete, M.; Casado, S.; Minelli, M.; Segura, A.; Bonetti, A.; Dinelli, G.; Fernández, A. Direct determination of aliphatic acids in honey by coelectroosmotic capillary zone electrophoresis. *Journal of Apicultural Research*. **2005**, 44(2), 65-70.
- Nozal Nalda, M. J.; Yagüe, J. L. B.; Diego Calva, J. C.; Martín Gómez, M. T. M. Classifying honeys from the Soria Province of Spain via multivariate analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2005**, 382(2), 311-319.
- Omode, P. E.; Ademukola, S. A. Determination of trace metals in Southern Nigerian honey by use of atomic absorption spectroscopy. *Spectroscopy Letters*. **2008**, 41, 328-331.
- Osman, K. A.; Al-Doghairi, M. A.; Al-Rehiayani, S.; Helal, M. I. D. Mineral contents and physicochemical properties of natural honey produced in Al-Qassim region, Saudi Arabia. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. **2007**, 5(3-4), 142-146.
- Pérez-Cerrada, M.; Herrero-Villén, M. A.; Maquieira, A. Sugar-rich food: Determination of inorganic anions by ionic chromatography. *Food Chemistry*. **1989**, 34(4), 285-294.
- Pisani, A.; Protano, G.; Riccobono, F. Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chemistry*. **2008**, 107, 1553-1560.

- 📖 Pohl, P.; Prusisz, B. Fractionation of calcium and magnesium in honeys, juices and tea infusions by ion exchange and flame absorption spectrometry. *Talanta*. **2006**, 69, 1227-1233.
- 📖 Pohl, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *Trends in Analytical Chemistry*. **2009**, 28(1), 117-128.
- 📖 Poiana, M.; Fuda, S.; Manziu, E.; Postorino, S.; Mincione, B. Research on commercial honeys in Italy-mineral fraction. *Industrie Alimentari*. **1996**, 35(348), 522-530.
- 📖 Popek, S. Application of regression analysis as a method to determine total ash content in some selected nectar honeys. *Nahrung-Food*. **2003a**, 47(1), 36-38.
- 📖 Popek, S. Identification of honey types. *Nahrung-Food*. **2003b**, 47(1), 39-40.
- 📖 Przybylowski, P.; Wilczynska, A. Honey as an environmental marker. *Food Chemistry*. **2001**, 74(3), 289-291.
- 📖 Radovic, B. S.; White, R.; Parker, I.; Dennis, M. J.; Sharman, M.; Geiss, H.; Anklam, E. Contribution of high temperature gas chromatographic analysis of oligosaccharides and ion chromatographic analysis of various cations and anions to authenticity testing of honey. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. **2001**, 97(10), 380-384.
- 📖 Rashed, M. N.; Soltan, M. E. Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2004**, 17, 725-735.
- 📖 Rodríguez-Otero, J. L.; Paseiro, P.; Simal, J.; Terradillos, L.; Cepeda, A. Determination of Na, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn and total cationic milliequivalents in Spanish commercial honeys. *Journal of Apicultural Research*. **1992**, 31(2), 65-69.

- 📖 Rodríguez-Otero, J. L.; Paseiro, P.; Simal, J.; Cepeda, A. Mineral content of the honeys produced in Galicia (north-west Spain). *Food Chemistry*. **1994**, 49, 169-171.
- 📖 Rodríguez-Otero, J. L.; Paseiro, P.; Simal, J.; Terradillos, L.; Cepeda, A. Silicon, phosphorus, sulphur, chlorine and ash contents of Spanish commercial honeys. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. **1995**, 200, 233-234.
- 📖 Rodríguez García, J. C.; Iglesias Rodríguez, R.; Peña Crecente, R. M.; Barciela García, J.; García Martín, S.; Herrero Latorre, C. Preliminary chemometric study on the use of honey as an environmental marker in Galicia (northwestern Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 7206-7212.
- 📖 Silici, S.; Dogan Uluzlu, O.; Tuzen, M.; Soylak, M. Assessment of trace element levels in Rhododendron honeys of Black Sea Region, Turkey. *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 156, 612-618.
- 📖 Stankovska, E.; Stafilov, T.; Sajn, R. Monitoring of trace elements in honey from the Republic of Macedonia by atomic absorption spectrometry. *Environmental Monitoring and Assessment*. **2008**, 142, 117-126.
- 📖 Suárez-Luque, S.; Mato, I.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J. Capillary zone electrophoresis method for the simultaneous determination of cations in honey. *Journal of Chromatography A*. **2005**, 1083(1-2), 193-198.
- 📖 Suárez-Luque, S.; Mato, I.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J. Rapid capillary zone electrophoresis method for the determination of metal cations in beverages. *Talanta*. **2006a**, 68, 1143-1147.
- 📖 Suárez-Luque, S.; Mato, I.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J.; Sancho, M. T. Capillary zone electrophoresis method for the determination of inorganic anions and formic acid in honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006b**, 54(25), 9292-9296.

- ☞ Suárez-Luque, S.; Mato, I.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J. Determination of major metal cations in milk by capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal*. **2007**, 17, 896-901.
- ☞ Talpay, B. Inhaltsstoffe des Honigs-Ameisensäure (Formiat). *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. **1989**. 85, 143-147.
- ☞ Terrab, A.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: I. River red gum (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) honey. *International Journal of Food Science and Technology*. **2003a**, 38(4), 379-386.
- ☞ Terrab, A.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: III. Other unifloral honey types. *International Journal of Food Science and Technology*. **2003b**, 38(4), 395-402.
- ☞ Terrab, A.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: II. Orange (*Citrus* sp.) honey. *International Journal of Food Science and Technology*. **2003c**, 38(4), 387-394.
- ☞ Terrab, A.; González, A. G.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution to the characterisation of unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2003d**, 83(7), 637-643.
- ☞ Terrab, A.; González, A. G.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. *European Food Research and Technology*. **2003e**, 218(1), 88-95.
- ☞ Terrab, A.; Heredia, F. J. Characterisation of avocado (*Persea americana* Mill) honeys by their physicochemical characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2004**, 84(13), 1801-1805.
- ☞ Terrab, A.; Hernanz, D.; Heredia, F. J. Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of minerals in thyme honeys and their

determination of geographical discrimination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004a**, 52(11), 3441-3445.

- 📖 Terrab, A.; Recamales, A. F.; Hernanz, D.; Heredia, F. J. Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry*. **2004b**, 88(4), 537-542.
- 📖 Terrab, A.; Recamales, A. F.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J. Contribution to the study of avocado honeys by their mineral contents using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Food Chemistry*. **2005**, 92(2), 305-309.
- 📖 Thibault, P.; Dovichi, N. J. General instrumentation and detection systems including mass spectrometric interfaces. En *Capillary Electrophoresis. Theory and practice*, 2nd ed.; Camilleri, P., Ed., Ed. CRC Press LLC: Boca Raton. Florida. USA, **1998**, pp 23-89.
- 📖 Timerbaev, A. R. Capillary electrophoresis of inorganic ions: An update. *Electrophoresis*. **2004**, 25, 4008-4031.
- 📖 Tong, S. S. C.; Morse, R. A.; Bache, C. A.; Lisk, D. J. Elemental analysis of honey as an indicator of pollution. *Archives of Environmental Health*. **1975**, 30, 329-332.
- 📖 Turhan, I.; Tetik, N.; Karhan, M.; Gurel, F.; Reyhan Tavukcuoglu, H. Quality of honeys influenced by thermal treatment. *LWT - Food Science and Technology*. **2008**, 41(8), 1396-1399.
- 📖 Turhan, K. Chemical contents and some trace metals of honeys produced in the Middle Anatolia region of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*. **2007**, 16(5), 459-464.
- 📖 Tuzen, M.; Silici, S.; Mendil, D.; Soylak, M. Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. *Food Chemistry*. **2007**, 103, 325-330.

- Uren, A.; Serifoglu, A.; Sarikahya, Y. Distribution of elements in honeys and effect of a thermoelectric power plant on the element contents. *Food Chemistry*. **1998**, 61(1/2), 185-190.
- Waters. CIA. System. Manual de operación. **1995**, Revision 3.0.
- White, J. W., Jr. *Honey (Advances in Food Research)*. New York, **1978**, Vol. 24, pp 287-374.
- Yang, J.; Bose, S.; Hage, D. S. Improved reproducibility in capillary electrophoresis through the use of mobility and migration time ratios. *Journal of Chromatography A*. **1996**, 735, 209-220.
- Yarsan, E.; Karacal, F.; Ibrahim, I. G.; Dikmen, B.; Koksai, A.; Das, Y. K. Contents of some metals in honeys from different regions in Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **2007**, 79, 255–258.
- Yazgan, S.; Horn, H.; Isengard, H. D. Honey as bio indicator by screening the heavy metal content of the environment. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. **2006**, 102(5), 192-194.
- Yilmaz, H.; Yavuz, O. Content of some trace metals in honey from south-eastern Anatolia. *Food Chemistry*. **1999**, 65, 475-476.

CAPÍTULO 6

Análisis estadístico



El análisis estadístico permite obtener gran cantidad de información de los parámetros analizados. Se van a llevar a cabo dos análisis diferentes:

- 1º. Se estudiarán las relaciones lineales que puedan existir entre los parámetros que se han determinado.
- 2º. Se realizará un análisis multivariante con el objeto de buscar modelos que sean capaces de diferenciar las muestras de miel según el origen botánico y el origen geográfico de procedencia del envasador de las mismas.

6.1 RELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS

6.1.1 Antecedentes bibliográficos

La relación entre la conductividad eléctrica y el contenido mineral de las mieles fue estudiada previamente por otros autores. *Sancho et al. (1991)* establecieron la relación entre la conductividad eléctrica y el contenido en cenizas con un coeficiente de correlación lineal de 0,9673. Posteriormente, *Bianchi (1992)* y *Sanz et al. (1994)* encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre ambos parámetros con coeficientes de 0,9889 y 0,89, respectivamente. Por último, *Kropf et al. (2008)*, establecieron un modelo de regresión lineal entre la conductividad eléctrica y el contenido en cenizas analizando estos parámetros en 290 muestras de miel de Eslovenia. Este modelo tiene un coeficiente de correlación lineal de 0,99.

La relación lineal entre el contenido de los diferentes minerales en las muestras de miel también fue estudiada en los últimos años. *Conti et al. (2007)* analizaron el contenido mineral de 69 mieles italianas y observaron la existencia de correlación lineal entre los contenidos de potasio y calcio ($r=0,645$), de potasio y manganeso ($r=0,670$) y de potasio y magnesio ($r=0,759$). Además observaron una importante correlación entre el contenido en calcio y en

magnesio ($r=0,928$), el contenido en calcio y en sodio ($r=0,825$) y el contenido en sodio y en magnesio ($r=0,826$). *Stankovska et al. (2008)* determinaron el contenido mineral de 123 mieles de la República de Macedonia encontrando existencia de correlación lineal entre el contenido en magnesio y manganeso ($r=0,85$), entre el contenido en calcio y magnesio ($r=0,64$) y entre el contenido en calcio y en manganeso ($r=0,55$).

6.1.2 Análisis de relaciones mediante regresión lineal

Este análisis se ha realizado utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1.

En aquellas muestras en las que no ha sido detectado uno de los parámetros analizados, se ha puesto el 0 como valor de ese parámetro. En el caso de valores no cuantificados se le ha dado el valor del límite de cuantificación a ese parámetro en esa muestra determinada.

6.1.2.1 Relaciones entre los parámetros físico químicos

Se ha llevado a cabo un análisis de correlaciones entre los parámetros físico químicos estudiados. Los resultados más significativos se muestran en la Tabla 6.1 en la que se indican las parejas de parámetros con coeficiente de correlación lineal igual o superior a 0,600 y, al menos un 99,9% de nivel de confianza.

La relación observada entre la conductividad eléctrica y el pH fue anteriormente descrita por *Corbella y Cozzolino (2006)* que al estudiar estos parámetros en 30 mieles observaron una correlación lineal con un coeficiente de 0,84.

Tabla 6.1

Correlaciones lineales significativas a un nivel de confianza del 99,9% y con un r igual o superior a 0,600 entre los parámetros físico químicos analizados.

Parámetros	r
Conductividad eléctrica – pH	0,617
Conductividad eléctrica – coordenada tricromática x	0,607
Conductividad eléctrica – coordenada tricromática y	-0,616
Conductividad eléctrica – longitud de onda dominante	0,629
Conductividad eléctrica – absorbancia neta	0,615
Coordenada tricromática x – coordenada tricromática y	-0,985
Coordenada tricromática x – longitud de onda dominante	0,977
Coordenada tricromática x – absorbancia neta	0,842
Coordenada tricromática y – longitud de onda dominante	-0,996
Coordenada tricromática y – absorbancia neta	-0,886
Longitud de onda dominante – absorbancia neta	0,915

6.1.2.2 Relaciones entre los parámetros físico químicos y el contenido mineral

Se ha llevado a cabo un estudio de la correlación lineal entre los parámetros físico químicos y el contenido en minerales de las muestras de miel analizadas. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6.2 en la que se presentan aquellas relaciones con un valor de correlación lineal igual o superior a 0,600.

Tabla 6.2

Correlaciones lineales significativas a un nivel de confianza del 99,9% entre los parámetros físico químicos y el contenido mineral de las muestras analizadas.

Parámetros	r
Conductividad eléctrica – contenido mineral total	0,933
Conductividad eléctrica – contenido total en cationes	0,970
Conductividad eléctrica – potasio	0,964
Conductividad eléctrica – magnesio	0,640
pH – contenido mineral total	0,626
pH – contenido total en cationes	0,614
pH – potasio	0,617

Cabe destacar que existe una gran correlación entre la conductividad eléctrica y el contenido mineral total por lo que se ha construido el gráfico de regresión lineal que describe esta correlación (Fig. 6.1).

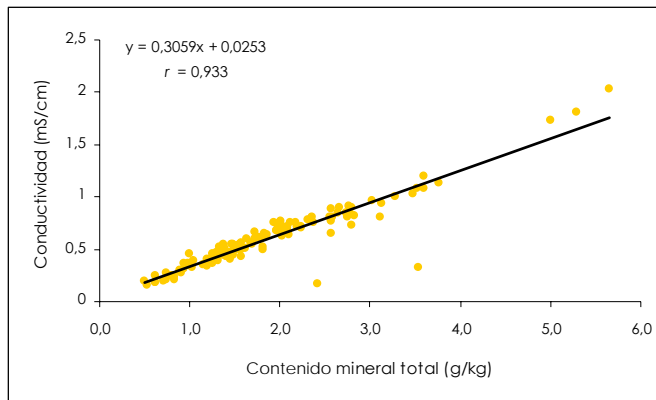


Figura 6.1 Representación gráfica de la correlación que existe entre la conductividad eléctrica y el contenido mineral total.

En esta representación gráfica se observa como hay 2 muestras que presentan valores muy alejados del resto. Estos valores son anómalos y al eliminarlos se obtiene una correlación lineal mucho mejor, como se puede comprobar en la Figura 6.2.

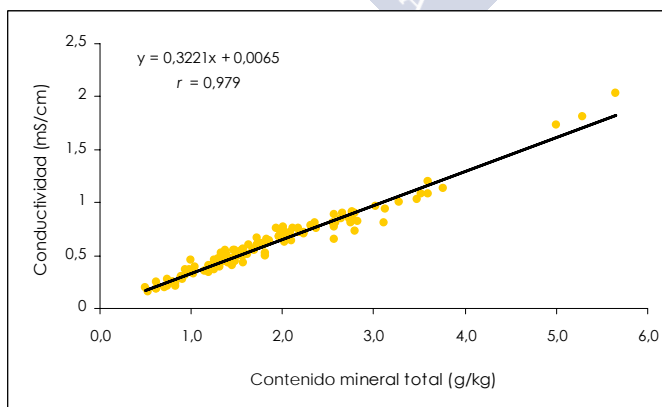


Figura 6.2 Representación gráfica de la correlación que existe entre la conductividad eléctrica y el contenido mineral total excluyendo los valores anómalos.

También se observa que existe una correlación lineal importante entre la conductividad eléctrica y el contenido total en cationes de las muestras ($r=0,970$) que aumenta considerablemente si se eliminan los valores anómalos ($r=0,989$).

6.1.2.3 Relaciones entre los componentes minerales de las muestras de miel analizadas

Para estudiar la relación entre el contenido de minerales de las mieles analizadas se ha realizado un análisis de correlación lineal encontrándose que existen numerosas parejas de parámetros con coeficientes de correlación lineal iguales o superiores a 0,600. Estos resultados se resumen en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3 Correlaciones lineales significativas a un nivel de confianza del 99,9% entre los diferentes componentes del contenido mineral de las muestras analizadas.

Parámetros	r
Contenido mineral total – contenido total en cationes	0,985
Contenido mineral total – potasio	0,972
Contenido mineral total – magnesio	0,723
Contenido mineral total – sulfato	0,717
Contenido total en cationes – potasio	0,996
Contenido total en cationes – magnesio	0,683
Contenido total en aniones inorgánicos – fosfato	0,847
Contenido total en aniones inorgánicos – sulfato	0,726
Potasio – magnesio	0,650
Magnesio – manganeso	0,669
Sulfato – fosfato	0,858

Existe una importante correlación entre el contenido en potasio y el contenido total en cationes y, también, entre la concentración de potasio en las mieles y el contenido mineral total. Esto es así porque el potasio es el componente mayoritario en el contenido mineral (59,3%) y, sobre todo, del contenido total en cationes en las mieles analizadas (84,0%). Esta correlación ya fue descrita

anteriormente (*Conti et al.*, 2007). Estos autores también encontraron correlación lineal entre el contenido en calcio y en magnesio que fue observada igualmente por *Stankovska et al.* (2008) obteniendo un coeficiente de correlación lineal de 0,650 y en las mieles objeto de este trabajo en las que se observó una correlación lineal con un coeficiente de 0,500.

Además, *Stankovska et al.* (2008) encontraron una correlación estadísticamente significativa entre el contenido en magnesio y en manganeso que también fue encontrada en este trabajo (Tabla 6.3).

Cabe destacar la alta correlación encontrada entre los contenidos en sulfato y fosfato ($r=0,858$) que no ha sido obtenida por otros autores.

Finalmente, se obtienen correlaciones lineales importantes entre el contenido total en aniones inorgánicos y el contenido en sulfato y entre el contenido total en aniones inorgánicos y el contenido en fosfato ambos con coeficientes de correlación lineal superiores al encontrado entre el contenido total en aniones inorgánicos y el contenido en cloruro ($r=0,594$) que es el anión mayoritario. Esto podría explicarse porque existen muestras en las que el contenido en fosfato es muy elevado, incluso superior al contenido en cloruro.



6.2 ANÁLISIS MULTIVARIANTE

6.2.1 Antecedentes bibliográficos

El análisis estadístico multivariante ha sido ampliamente utilizado en muestras de miel con objetivos entre los que destacan averiguar si una miel ha sido adulterada o clasificar las muestras de miel según su origen botánico o su origen geográfico.

Se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica sistemática en las bases de datos MEDLINE y SCOPUS. Se estableció como período de búsqueda hasta el 9 de febrero de 2009 combinando los términos “honey” y “statistical analysis” (en título, resumen o palabras clave). Se consideraron los artículos publicados en español, francés, inglés, italiano y portugués. Como herramienta de selección se utilizó la lectura del resumen excluyendo los trabajos en los que no se realizaba análisis estadístico multivariante. Así, se han considerado 46 artículos, dos de los cuales son revisiones bibliográficas.

Una de las revisiones bibliográficas publicadas es la de *Tzouros y Arvanitoyannis (2001)* en la que se resumen los métodos para la determinación de la autenticidad de varios alimentos entre los que se encuentra la miel. También aplicaron la quimiometría para la clasificación de los mismos según su origen geográfico.

En la revisión bibliográfica llevada a cabo por *Anklam (1998)* se muestran los diferentes componentes de la miel, entre ellos el contenido mineral, utilizados para intentar clasificar las mieles en función del espectro polínico o del origen botánico y los métodos de determinación de los mismos.

En la Tabla 6.4 se resumen los estudios en los que se han utilizado técnicas multivariantes con el objeto de caracterizar las muestras de miel según su origen botánico, origen geográfico o ambos. Para realizar este análisis estadístico, en algunos casos se determinan parámetros de la miel y, en otros casos, mediante una técnica analítica como la espectroscopía de infrarrojo o la lengua electrónica se obtiene una gran cantidad de datos que son analizados mediante técnicas estadísticas multivariantes que facilitan la obtención de conclusiones.

Tabla 6.4 | Estudios en los que se han utilizado técnicas multivariantes con el objeto de caracterizar las muestras de miel según su origen botánico, origen geográfico y ambos.
(continúa)

Tipo de caracterización	Autores	Parámetros analizados o técnicas analíticas	n	Análisis multivariante realizado
Origen botánico	Mateo y Bosch-Reig (1998)	Humedad, conductividad eléctrica, pH, color y azúcares	101	Análisis discriminante por etapas
	Terrab et al. (2002)	Color	112	Análisis discriminante por etapas
	Terrab et al. (2003a)	Humedad, conductividad eléctrica, pH, acidez libre, acidez láctica, actividad diastásica, hidroximetilfurfural, minerales, color y azúcares	39	Análisis de componentes principales Análisis discriminante por etapas Análisis cluster Redes neuronales (MLP)
	Terrab et al. (2003b)	Minerales y conductividad eléctrica	98	Análisis de componentes principales Análisis lineal discriminante
	Cotte et al. (2004a)	Azúcares	280	Análisis de componentes principales
	Cotte et al. (2004b)	Aminoácidos	280	Análisis de componentes principales
	Devillers et al. (2004)	Humedad, conductividad eléctrica, actividad diastásica, pH, acidez libre, color, hidroximetilfurfural y azúcares	69	Análisis de componentes principales Análisis discriminante por etapas
	Nozal et al. (2004)	Aminoácidos	74	Análisis de componentes principales
	Rashed y Soltan (2004)	Minerales	20	Análisis cluster
	Serrano et al. (2004)	Parámetros físico químicos, hidroximetilfurfural, azúcares, actividad de agua y sólidos insolubles en agua	29	Análisis de componentes principales Análisis discriminante por etapas
	Terrab et al. (2004)	Color	36	Análisis cluster Análisis lineal simple
	Fernández-Torres et al. (2005)	Minerales	40	Análisis de componentes principales Análisis cluster Análisis lineal discriminante
	González-Miret et al. (2005)	Minerales y color	77	Regresión lineal múltiple Análisis lineal discriminante Análisis discriminante por etapas
	Nozal et al. (2005)	Azúcares	77	Análisis de componentes principales Análisis discriminante de variables canónicas
	Baroni et al. (2006)	Compuestos volátiles	42	Análisis cluster Análisis discriminante por etapas Análisis de los K vecinos más próximos
	Cometto et al. (2006)	Espectroscopía de infrarrojo	39	Análisis de componentes principales Análisis cluster Análisis de correspondencia múltiple
	Corbella y Cozzolino (2006)	Humedad, conductividad eléctrica, pH, hidroximetilfurfural y color	30	Análisis de componentes principales Análisis lineal discriminante
	Ruoff et al. (2006a)	Espectroscopía de infrarrojo	364	Análisis de componentes principales Análisis lineal discriminante
	Bertelli et al. (2007)	Espectroscopía de infrarrojo	82	Análisis de componentes principales Análisis general discriminante Análisis cluster
	Conti et al. (2007)	Minerales, pH, humedad y azúcares	69	Análisis de componentes principales Análisis lineal discriminante
	Karoui et al. (2007)	Espectroscopía de fluorescencia	62	Análisis de componentes principales Análisis discriminante factorial

Tabla 6.4
(continuación)

Estudios en los que se han utilizado técnicas multivariantes con el objeto de caracterizar las muestras de miel según su origen botánico, origen geográfico y ambos.

Tipo de caracterización	Autores	Parámetros analizados o técnicas analíticas	n	Análisis multivariante realizado
Origen botánico	Dias et al. (2008)	Lengua electrónica	52	Análisis de componentes principales Análisis lineal discriminante
	Lolli et al. (2008)	Resonancia magnética nuclear	71	Análisis de componentes principales Análisis general discriminante
	Madajczyk y Baralkiewicz (2008)	Minerales	30	Análisis cluster
	Montenegro y Fredes (2008)	Minerales	61	Análisis de componentes principales
	Saric et al. (2008)	Parámetros físico químicos	254	Análisis de componentes principales Análisis cluster
	Soria et al. (2008)	Compuestos volátiles	22	Análisis de componentes principales Análisis lineal simple
Origen geográfico	Latorre et al. (1999)	Minerales	42	Análisis de componentes principales Análisis lineal discriminante Análisis de los K vecinos más próximos Análisis de modelado independiente suave de analogía de clase (SIMCA)
	Gómez Báñez et al. (2000)	Azúcares y parámetros físico químicos	60	Análisis lineal discriminante
	González-Paramás et al. (2000)	Minerales y parámetros físico químicos	60	Análisis lineal discriminante
	Latorre et al. (2000)	Minerales	42	Análisis de componentes principales Análisis cluster Método de Bayes Redes neuronales Regresión sobre mínimos cuadrados parciales
	Cometto et al. (2003)	Aminoácidos	56	Análisis cluster Análisis de componentes principales Análisis de correspondencia múltiple
	Hernández et al. (2005)	Minerales	116	Análisis de componentes principales Análisis cluster Análisis lineal discriminante Regresión logística
	Bagci et al. (2007)	Minerales	43	Análisis cluster
	Woodcock et al. (2007)	Espectroscopía de infrarrojo	167	Análisis de componentes principales Análisis de modelado independiente suave de analogía de clase (SIMCA) Regresión sobre mínimos cuadrados parciales
	Hennessy et al. (2008)	Espectroscopía de infrarrojo	150	Análisis de componentes principales Análisis de modelado independiente suave de analogía de clase (SIMCA) Regresión sobre mínimos cuadrados parciales
	Radovic et al. (2001)	Minerales y azúcares	40	Análisis lineal discriminante
Origen botánico y geográfico	Soria et al. (2004)	Compuestos volátiles y parámetros físico químicos	46	Análisis de componentes principales Análisis discriminante por etapas
	Ruoff et al. (2006b)	Espectroscopía de fluorescencia	371	Análisis de componentes principales Análisis lineal discriminante
	Ruoff et al. (2006c)	Espectroscopía de infrarrojo	411	Análisis de componentes principales Análisis lineal discriminante
	Consonni y Cagliani (2008)	Azúcares	41	Análisis de componentes principales

Como se puede observar en la Tabla 6.4, la combinación de la espectroscopía de infrarrojo con el análisis estadístico multivariante es la herramienta más utilizada en los últimos años para la discriminación de las mieles en función de su origen botánico o de su origen geográfico.

También se utiliza con frecuencia el **contenido mineral** para esta tarea. *Radovic et al. (2001)* obtienen la correcta clasificación de mieles de varios orígenes botánicos mediante el análisis del contenido mineral de las mismas. Además, con la determinación del contenido mineral y de la conductividad eléctrica junto con un análisis de componentes principales y un análisis lineal discriminante se consigue la correcta clasificación de las mieles de *Eucalyptus* sp. y de las mieles de mielada (*Terrab et al., 2003b*). Un análisis cluster revela que el contenido mineral de las mieles está relacionado con el origen botánico de las mismas (*Rashed y Soltan, 2004*). Por último, las mieles de acacia, las mieles de mielada y el 90% de las mieles multiflorales fueron correctamente clasificadas con un análisis lineal discriminante y la determinación del contenido mineral, los azúcares, la humedad y el pH de las muestras (*Conti et al., 2007*).

Además de las referencias descritas en la tabla, cabe destacar los estudios de *Cordella et al. (2003)* y *Cotte et al. (2003)* en los que se muestra la utilidad de la determinación de azúcares junto con el análisis de componentes principales para detectar si una miel ha sido adulterada mediante la adición de azúcares artificiales. Con este mismo objetivo se analizaron muestras de miel mediante espectroscopía de infrarrojo cercano obteniendo resultados satisfactorios (*Toher et al., 2007*).

6.2.2 Análisis estadístico multivariante

Este análisis se ha realizado utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1.

En primer lugar se va a utilizar una técnica de reducción de datos para ver cuáles de los 19 parámetros estudiados: contenido en potasio, calcio, sodio, magnesio, manganeso, níquel, litio, cloruro, nitrato, sulfato, ácido fórmico, fosfato, conductividad eléctrica, pH, los parámetros de color (coordenadas tricromáticas x e y, longitud de onda dominante y absorbancia neta) y turbidez influyen en mayor medida en la variabilidad.

En aquellas muestras en las que no ha sido detectado uno de los parámetros analizados, se ha puesto el 0 como valor de ese parámetro. En el caso de valores no cuantificados se le ha dado el valor del límite de cuantificación a ese parámetro en esa muestra.

Se han eliminado los valores anómalos de las dos muestras que se detectaron al estudiar las relaciones entre los parámetros de manera que se tiene un total de 123 muestras de miel para el análisis estadístico.

6.2.2.1 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales es un método estadístico que fue propuesto por *Pearson (1901)* y de forma independiente también por *Hotelling (1933)*. Consiste en describir la variación producida por la observación de un número de variables aleatorias en términos de un conjunto de nuevas variables denominadas componentes principales, cada una de las cuales, será una combinación lineal de las variables originales. Estas nuevas variables son obtenidas en orden de importancia, de manera que la primera componente principal incorpora la mayor cantidad posible de variación debida a las variables originales; la segunda componente principal se elige de forma que explique la mayor cantidad posible de variación que falta por explicar, y así sucesivamente (*García Pérez, 2005*). Además, se impone la condición de que las componentes principales sean ortogonales entre sí, con lo que el procedimiento produce un nuevo sistema de ejes no correlacionados que explican al máximo la varianza original de los datos.

El propósito de este análisis es ver si las primeras componentes principales reúnen la mayor parte de la variación producida por las variables estudiadas. De ser así, si se consideran solamente estas primeras componentes principales, se reduce la dimensionalidad de los datos y apenas se pierde información relevante, siendo posible la proyección gráfica de los resultados y con ello, la observación de la posible estructura en los datos disponibles.

Para llevar a cabo este análisis, los valores de las variables se han estandarizado substrayendo sus medias y dividiéndolas por sus desviaciones típicas.

Como resultado se obtiene el gráfico de sedimentación que se muestra en la Figura 6.3.

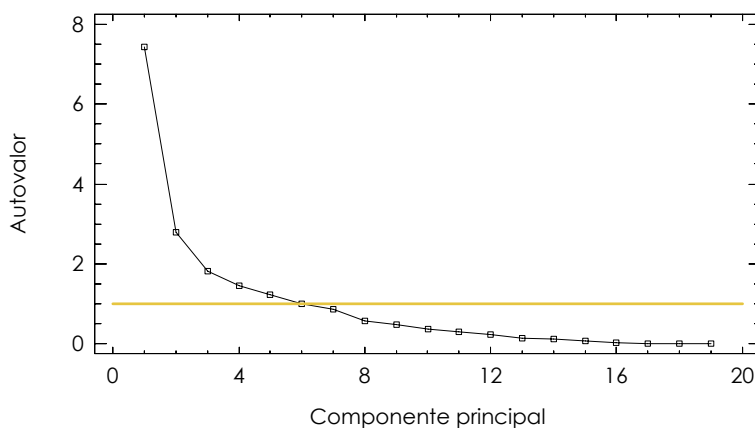


Figura 6.3 Gráfica de sedimentación obtenida al llevar a cabo el análisis de componentes principales en las mieles con los parámetros objeto de este trabajo.

De esta gráfica se deduce que se deben extraer las primeras 6 componentes principales ya que son las que tienen autovalores mayores o iguales a 1 y explican el 82,3% de la variabilidad de los datos originales.

Se estudiará a continuación cuáles son los parámetros que forman parte de estas 6 componentes principales a partir de la tabla de los pesos de cada parámetro en cada componente principal (Tabla 6.5). Para la determinación de estos pesos se ha llevado a cabo una rotación varimax de las componentes principales, de manera que las variables que más aportan a cada componente principal tienen aún más peso que sin tener en cuenta la rotación. Esta herramienta permitirá seleccionar con mayor facilidad el parámetro que más aporta en cada componente principal.

Tabla 6.5 Pesos de los diferentes parámetros en cada una de las componentes principales.

Parámetro	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
Potasio	0,369937	0,421760	0,780802	-0,116082	0,078204	-0,065072
Calcio	-0,147350	0,786679	0,138662	0,422229	0,124128	-0,014026
Sodio	0,277909	-0,168348	-0,092105	0,821574	-0,015059	-0,081885
Magnesio	0,274733	0,849384	0,220937	-0,287257	-0,030587	-0,034065
Manganeso	0,177534	0,721249	0,154562	0,057909	-0,405653	0,226353
Níquel	0,090173	0,041282	0,019984	-0,031380	0,089296	0,923795
Litio	0,071968	-0,170411	0,663221	0,001617	-0,032430	0,242224
Cloruro	-0,233996	-0,012095	-0,059852	0,868925	0,103983	0,035048
Nitrato	0,113128	0,092131	0,082591	0,115456	0,907743	0,118870
Sulfato	0,230340	0,709217	0,239320	-0,284622	0,437329	-0,032133
Ácido fórmico	0,336151	0,172199	0,746237	-0,116659	0,044777	-0,087479
Fosfato	0,258058	0,741315	0,139434	-0,417708	0,282111	-0,041227
Conductividad eléctrica	0,431968	0,456510	0,728631	-0,023349	0,070735	-0,084715
pH	-0,104733	0,368649	0,697200	-0,033326	0,078400	-0,052192
Coordenada tricromática x	0,930918	0,206220	0,139761	-0,009959	0,007233	-0,049218
Coordenada tricromática y	-0,953649	-0,183605	-0,164588	0,006059	-0,030235	0,023040
Longitud de onda dominante	0,954794	0,169040	0,192141	-0,003844	0,028811	-0,012207
Absorbancia neta	0,877668	0,032805	0,321904	0,021596	0,054197	0,066514
Turbidez	0,574111	-0,018040	-0,033481	-0,064057	0,060946	0,139623

En esta tabla se observa que los coeficientes de mayor peso de la primera componente principal son los correspondientes a los parámetros del color. Los contenidos en calcio y en magnesio poseen los mayores pesos en la segunda componente principal y el contenido en potasio y el contenido en ácido fórmico en la tercera componente. En la cuarta lo tienen los contenidos en cloruro y sodio, el contenido en nitrato en la quinta y el parámetro con mayor peso en la sexta componente principal es el níquel.

Llegado a este punto, se debe seleccionar el número de variables para llevar a cabo el estudio mediante análisis lineal discriminante.

En primer lugar, se seleccionaron las 6 variables que parecen más características en el análisis de componentes principales (coordenada tricromática y, contenido en calcio, contenido en potasio y contenidos en cloruro, nitrato y níquel) y se realizó el estudio estadístico mediante el análisis lineal discriminante.

En segundo lugar, se llevó a cabo el mismo análisis pero con los 19 parámetros estudiados. Con este último, se obtuvieron resultados un 20% mejores en términos de muestras correctamente clasificadas por lo que se seleccionó este análisis y se presenta a continuación.

6.2.2.2 Análisis lineal discriminante

Este procedimiento se diseña para desarrollar una serie de funciones discriminantes que pueden ayudar a predecir el origen botánico de las mieles basado en los valores de los parámetros analizados.

El estudio se va a llevar a cabo con todos los parámetros analizados. Se van a realizar los siguientes análisis:

- Con las 123 muestras:
 1. Diferenciación según el origen botánico.
 2. Clasificación según la comunidad autónoma de procedencia.
 3. Discriminación entre las mieles de Galicia con “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” y las que proceden de otras zonas de España.
- Con las muestras de Galicia con “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” (n=75), clasificación teniendo en cuenta la provincia de procedencia.

6.2.2.2.1 Análisis lineal discriminante en función del origen botánico de las muestras de miel

Se utilizaron las 123 muestras para desarrollar un modelo que clasifique las muestras en los 12 orígenes botánicos encontrados en las mieles de este estudio (*Castanea sativa* Miller, *Citrus* sp., *Echium* sp., *Erica* sp., *Eucalyptus* sp.,

Lavandula sp., *Rosmarinus* sp., *Rosmarinus* y *Trifolium* sp., *Rubus* sp., *Trifolium* L. sp., multiflora y multiflora y de mielada). Se introdujeron las 19 variables pronosticadas resultando que las 3 funciones discriminantes con p-valores inferiores a 0,05 son estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza.

El modelo que se obtiene es capaz de clasificar correctamente el 73,2% de las muestras de miel. Al analizar las funciones utilizadas para clasificar las mieles se observa que los parámetros de color (principalmente la coordenada tricromática y) son los parámetros que más peso tienen.

El bajo porcentaje de correcta clasificación puede ser debido a se tienen pocas muestras de miel de algunos orígenes botánicos. Sería necesario analizar un mayor número de muestras para obtener mejores resultados.

6.2.2.2.2 Análisis lineal discriminante teniendo en cuenta la comunidad autónoma de procedencia del envasador de las muestras de miel

Este procedimiento se diseña para predecir la comunidad autónoma de origen de las muestras de miel, según los valores de todos los parámetros analizados.

El modelo que se propone clasifica correctamente el 83,7% de las muestras analizadas. Cabe destacar que se clasifican correctamente el 89,3% de las muestras de Galicia con “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” (Tabla 6.6).

Tabla 6.6 Resultados de clasificación mediante el análisis lineal discriminante realizado.

Parámetro	n	Castilla La Mancha	Castilla y León	Comunidad Valenciana	Extremadura	Galicia
Castilla La Mancha	6	5 (83,3%)	1	0	0	0
Castilla y León	32	4	23 (71,9%)	2	0	3
Comunidad Valenciana	8	0	0	6 (75,0%)	1	1
Extremadura	2	0	0	0	2 (100%)	0
Galicia	75	0	7	1	0	67 (89,3%)

6.2.2.2.3 Análisis lineal discriminante para diferenciar las mieles de Galicia con “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” de las procedentes de otras comunidades autónomas

El modelo obtenido clasifica correctamente el 91,1% de las 123 muestras. En la Tabla 6.7 se indica el número de muestras que han sido clasificadas con éxito mediante el modelo propuesto.

Tabla 6.7 Clasificación de las muestras de miel mediante el modelo obtenido.

Actual	n	Pronosticados	
		Galicia	Otras comunidades autónomas
Galicia	75	69 (92,0%)	6
Otras comunidades autónomas	48	5	43 (89,6%)

En la Figura 6.4 se muestra el gráfico de dispersión de las mieles cuando se someten a este análisis estadístico llevado a cabo con los 19 parámetros analizados. En ella se aprecia como existe una clara diferenciación de los grupos.

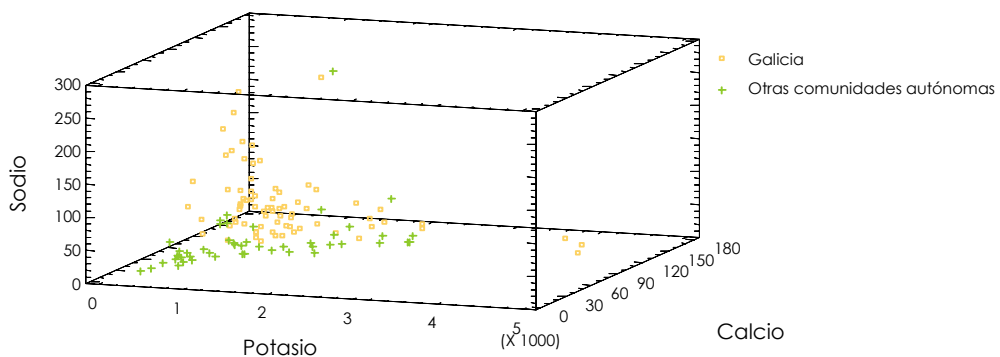


Figura 6.4 Gráfico de dispersión obtenido al llevar a cabo el análisis lineal discriminante para diferenciar las mieles gallegas de las procedentes de otras comunidades autónomas.

Por último, en la Tabla 6.8 aparecen todas las funciones utilizadas por el modelo para clasificar las muestras de miel. En esta tabla se puede observar que los parámetros del color (fundamentalmente la coordenada tricromática y) son las funciones con valor más elevado por lo que son las más importantes en la clasificación.

Estos resultados muestran la utilidad del análisis de los parámetros estudiados en las muestras de miel para discriminar las mieles con “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia”

Tabla 6.8

Funciones de clasificación de las muestras obtenidas en el modelo que identifica las mieles gallegas.

Parámetro	Galicia	Otras comunidades autónomas
Potasio	-0,878546	-0,86357
Calcio	7,45914	7,4131
Sodio	-0,932419	-0,931124
Magnesio	-9,33533	-9,35988
Manganeso	3,36287	3,24328
Níquel	-8,04384	-7,68798
Litio	158,849	158,831
Cloruro	-0,502769	-0,500374
Nitrato	14,3419	14,1067
Sulfato	0,392182	0,425637
Ácido fórmico	1,85256	1,84576
Fosfato	2,26975	2,30515
Conductividad eléctrica	883,821	844,217
pH	126,911	124,22
Coordenada tricromática x	19348,3	19367,6
Coordenada tricromática y	457828,0	457838,0
Longitud de onda dominante	2148,16	2148,08
Absorbancia neta	-3105,83	-3108,19
Turbidez	301,287	303,726
CONSTANTE	-735038,0	-734989,0

6.2.2.2.4 Análisis lineal discriminante de las mieles de Galicia con “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” en función de la provincia del envasador

Se ha llevado a cabo un análisis lineal discriminante con las muestras de las cuatro provincias gallegas obteniéndose un porcentaje de acierto en la clasificación del 80,0% en el total de las muestras. Los resultados de correcta clasificación se resumen en la Tabla 6.9.

Tabla 6.9 Clasificación de las muestras de miel mediante el modelo obtenido que agrupa las muestras según la provincia de procedencia del envasador.

Actual	n	Pronosticados			
		A Coruña	Lugo	Ourense	Pontevedra
A Coruña	22	17 (77,3%)	3	0	2
Lugo	24	3	17 (70,8%)	2	2
Ourense	15	0	1	13 (86,7%)	1
Pontevedra	14	0	1	0	13 (92,9%)

En esta tabla se observa que el 92,9% de las muestras de Pontevedra y el 86,7% de las mieles de Ourense fueron clasificadas correctamente.

De nuevo, los parámetros del color (principalmente la coordenada tricromática y) y la conductividad eléctrica son los que tienen mayor peso en la función discriminante.

6.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 📖 Anklam, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*. **1998**, 63(4), 549-562.
- 📖 Bagci, Y.; Arslan, D.; Ozcan, M. M.; Dursun, N. Determination of the mineral content of bee honeys produced in Middle Anatolia. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **2007**, 58(7), 567-575.
- 📖 Baroni, M. V.; Nores, M. L.; Díaz, M. P.; Chiabrando, G. A.; Fassano, J. P.; Costa, C.; Wunderlin, D. A. Determination of volatile organic compound patterns characteristic of five unifloral honey by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 7235-7241.
- 📖 Bertelli, D.; Plessi, M.; Sabatini, A. G.; Lolli, M.; Grillenzoni, F. Classification of Italian honeys by mid-infrared diffuse reflectance spectroscopy (DRIFTS). *Food Chemistry*. **2007**, 101(4), 1565-1570.
- 📖 Bianchi, E. M. Determining the mineral (ash %) content in honey by conductometric analysis. *Apiacta*. **1992**, 27, 19-24.
- 📖 Cometto, P. M.; Faye, P. F.; Di Paola Naranjo, R.; Rubio, M. A.; Aldao, M. A. J. Comparison of free amino acids profile in honey from three Argentinian regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51(17), 5079-5087.
- 📖 Cometto, P. M.; Faye, P. F.; Caccavari, M.; Baroni, M. V.; Aldao, M. A. J. Relationship between interannual variation of amino acid profile and pollen content in honey from a small Argentinian region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54(25), 9458-9464.
- 📖 Consonni, R.; Cagliani, L. R. Geographical characterization of polyfloral and acacia honeys by nuclear magnetic resonance and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, 56(16), 6873-6880.

- Conti, M. E.; Stripeikis, J.; Campanella, L.; Cucina, D.; Tudino, M. B. Characterization of Italian honeys (Marche Region) on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. *Chemistry Central Journal*. **2007**, 1, 1-14.
- Corbella, E.; Cozzolino, D. Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics. *LWT- Food Science and Technology*. **2006**, 39, 534-539.
- Cordella, C. B. Y.; Militao, J. S. I.; Cleament, M. C.; Cabrol-Bass, D. Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC-PAD profiles. 1. Honey floral species characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 3234-3242.
- Cotte, J. F.; Casabianca, H.; Chardon, S.; Lheritier, J.; Grenier-Loustalot, M. F. Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *Journal of Chromatography A*. **2003**, 1021(1-2), 145-155.
- Cotte, J. F.; Casabianca, H.; Chardon, S.; Lheritier, J.; Grenier-Loustalot, M. F. Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2004a**, 380(4), 698-705.
- Cotte, J. F.; Casabianca, H.; Giroud, B.; Albert, M.; Lheritier, J.; Grenier-Loustalot, M. F. Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2004b**, 378(5), 1342-1350.
- Devillers, J.; Morlot, M.; Pham-Delegue, M. H.; Dore, J. C. Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry*. **2004**, 86(2), 305-312.
- Dias, L. A.; Peres, A. M.; Vilas-Boas, M.; Rocha, M. A.; Estevinho, L.; Machado, A. A. S. C. An electronic tongue for honey classification. *Microchimica Acta*. **2008**, 163(1-2), 97-102.

- 📖 Fernández-Torres, R.; Pérez-Bernal, J. L.; Bello-López, M. A.; Callejón-Mochón, M.; Jiménez-Sánchez, J. C.; Guiraum-Pérez, A. Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta*. **2005**, 65(3), 686-691.
- 📖 García Pérez, A. *Métodos avanzados de estadística aplicada. Técnicas avanzadas*. Primera edición ed.; Lerko Print, S.A.: Madrid, **2005**.
- 📖 Gómez Bárez, J. A.; García-Villanova, R. J.; Elvira García, S.; Rivas Palá, T.; González Paramás, A. M.; Sánchez Sánchez, J. Geographical discrimination of honeys through the employment of sugar patterns and common chemical quality parameters. *European Food Research and Technology*. **2000**, 210, 437-444.
- 📖 González-Miret, M. L.; Terrab, A.; Hernanz, D.; Fernández-Recamales, M. A.; Heredia, F. J. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53(7), 2574-2580.
- 📖 González-Paramás, A. M.; Bárez, J. A. G.; García-Villanova, R. J.; Pala, T. R.; Albajar, R. A.; Sánchez, J. S. Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, 80(1), 157-165.
- 📖 Hennessy, S.; Downey, G.; O'Donnell, C. Multivariate analysis of attenuated total reflection-fourier transform infrared spectroscopic data to confirm the origin of honeys. *Applied Spectroscopy*. **2008**, 62(10), 1115-1123.
- 📖 Hernández, O. M.; Fraga, J. M. G.; Jiménez, A. I.; Jiménez, F.; Arias, J. J. Characterization of honey from the Canary Islands: Determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. *Food Chemistry*. **2005**, 93(3), 449-458.
- 📖 Hotelling, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*. **1933**, 24, 417-441.

- 📖 Karoui , R.; Dufour, E.; Bosset, J. O.; De Baerdemaeker, J. The use of front face fluorescence spectroscopy to classify the botanical origin of honey samples produced in Switzerland. *Food Chemistry*. **2007**, 101, 314-323.
- 📖 Kropf, U.; Jamnik, M.; Bertoncelj, J.; Golob, T. Linear regression model of the ash mass fraction and electrical conductivity for Slovenian honey. *Food Technology and Biotechnology*. **2008**, 46(3), 335-340.
- 📖 Latorre, M. J.; Peña, R.; Pita, C.; Botana, A.; García, S.; Herrero, C. Chemometric classification of honeys according to their type. II. Metal content data. *Food Chemistry*. **1999**, 66, 263-268.
- 📖 Latorre, M. J.; Peña, R.; García, S.; Herrero, C. Authentication of Galician (N.W. Spain) honeys by multivariate techniques based on metal content data. *The Analyst*. **2000**, 125, 307-312.
- 📖 Lolli, M.; Bertelli, D.; Plessi, M.; Sabatini, A. G.; Restani, C. Classification of Italian honeys by 2D HR-NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, 56(4), 1298-1304.
- 📖 Madejczyk, M.; Baralkiewicz, D. Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. *Analytica Chimica Acta*. **2008**, 617(1-2), 11-17.
- 📖 Mateo, R.; Bosch-Reig, F. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars, and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1998**, 46(2), 393-400.
- 📖 Montenegro, G.; Fredes, C. Relación entre el origen floral y el perfil de elementos minerales en mieles chilenas. *Gayana Botánica*. **2008**, 65(1), 123-126.
- 📖 Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Toribio, M. L.; Diego, J. C.; Ruiz, A. Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. **2004**, 1047(1), 137-146.

- 📖 Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Toribio, M. L.; Alamo, M.; Diego, J. C. The use of carbohydrate profiles and chemometrics in the characterization of natural honeys of identical geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, 3095-3100.
- 📖 Pearson, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*. **1901**, 2, 559-572.
- 📖 Radovic, B. S.; White, R.; Parker, I.; Dennis, M. J.; Sharman, M.; Geiss, H.; Anklam, E. Contribution of high temperature gas chromatographic analysis of oligosaccharides and ion chromatographic analysis of various cations and anions to authenticity testing of honey. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. **2001**, 97(10), 380-384.
- 📖 Rashed, M. N.; Soltan, M. E. Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2004**, 17, 725-735.
- 📖 Ruoff, K.; Luginbuhl, W.; Bogdanov, S.; Bosset, J. O.; Estermann, B.; Ziolk, T.; Amado, R. Authentication of the botanical origin of honey by near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006a**, 54, 6867-6872.
- 📖 Ruoff, K.; Luginbuhl, W.; Kunzuli, R.; Bogdanov, S.; Bosset, J. O.; Von der Ohe, K.; Von der Ohe, W.; Amado, R. Authentication of the botanical and geographical origin of honey by front-face fluorescence spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006b**, 54, 6858-6866.
- 📖 Ruoff, K.; Luginbuhl, W.; Kunzuli, R.; Iglesias, M. T.; Bogdanov, S.; Bosset, J. O.; Von der Ohe, K.; Von der Ohe, W.; Amado, R. Authentication of the botanical and geographical origin of honey by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006c**, 54, 6873-6880.

- Sancho, M. T.; Muniategui, S.; Sánchez, M. P.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J. Relationships between electrical conductivity and total and sulphated ash contents in basque honeys. *Apidologie*. **1991**, 22, 487-494.
- Sanz, S.; Pérez, C.; Herrera, A.; Sanz, M.; Juan, T. Composición de las mieles de la Rioja. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. **1994**, 34(5), 540-552.
- Saric, G.; Matkovic, D.; Hruskar, M.; Vahcic, N. Characterisation and classification of Croatian honey by physicochemical parameters. *Food Technology and Biotechnology*. **2008**, 46(4), 355-367.
- Serrano, S.; Villarejo, M.; Espejo, R.; Jodral, M. Chemical and physical parameters of Andalusian honey: Classification of *Citrus* and *Eucalyptus* honeys by discriminant analysis. *Food Chemistry*. **2004**, 87(4), 619-625.
- Soria, A. C.; González, M.; De Lorenzo, C.; Martínez-Castroa, I.; Sanza, J. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chemistry*. **2004**, 85(1), 121-130.
- Soria, A. C.; Martínez-Castro, I.; Sanz, J. Some aspects of dynamic headspace analysis of volatile components in honey. *Food Research International*. **2008**, 41(8), 838-848.
- Stankovska, E.; Stafilov, T.; Sajin, R. Monitoring of trace elements in honey from the Republic of Macedonia by atomic absorption spectrometry. *Environmental Monitoring and Assessment*. **2008**, 142, 117-126.
- Terrab, A.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Chromatic characterisation of Moroccan honeys by diffuse reflectance and tristimulus colorimetry - Non-uniform and uniform colour spaces. *Food Science and Technology International*. **2002**, 8(4), 189-195.

- 📖 Terrab, A.; González, A. G.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. *European Food Research and Technology*. **2003a**, 218(1), 88-95.
- 📖 Terrab, A.; González, A. G.; Díez, M. J.; Heredia, F. J. Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution to the characterisation of unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2003b**, 83(7), 637-643.
- 📖 Terrab, A.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J. Colour characterisation of thyme and avocado honeys by diffuse reflectance spectrophotometry and spectroradiometry. *European Food Research and Technology*. **2004**, 218, 488-492.
- 📖 Toher, D.; Downey, G.; Murphy, T. B. A comparison of model-based and regression classification techniques applied to near infrared spectroscopic data in food authentication studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **2007**, 89(2), 102-115.
- 📖 Tzouros, N. E.; Arvanitoyannis, I. S. Agricultural produces: Synopsis of employed quality control methods for the authentication of foods and application of chemometrics for the classification of foods according to their variety or geographical origin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2001**, 41(4), 287-319.
- 📖 Woodcock, T.; Downey, G.; Kelly, J. D.; O'Donnell, C. Geographical classification of honey samples by near-infrared spectroscopy: A feasibility study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55(22), 9128-9134.





CAPÍTULO 7

Conclusiones



Los resultados obtenidos en la realización de esta Tesis Doctoral permiten establecer las conclusiones que se detallan a continuación:

- ✍ En relación al estudio bibliográfico de los métodos empleados en la determinación de aniones y cationes en la miel:
 1. Las técnicas más utilizadas para la determinación de aniones y cationes en la miel son las espectroscópicas.
 2. No se han llevado a cabo estudios de determinación de aniones y cationes en la miel mediante electroforesis capilar con anterioridad a este trabajo.
- ✍ En relación a la determinación de los parámetros físico químicos relacionados con los minerales:
 3. Se han determinado la conductividad eléctrica, el pH, los parámetros de color (coordenadas tricromáticas x e y, longitud de onda dominante y absorbancia neta) y turbidez en las 125 muestras de miel.
 4. Se ha aplicado, por primera vez en muestras de miel, un sistema de cálculo de la longitud de onda dominante que se utiliza en la determinación del color de los vinos y que evita la representación manual de cada muestra sobre un diagrama en papel.
- ✍ Sobre la puesta a punto de métodos analíticos para la determinación de los aniones y cationes mediante electroforesis capilar:
 5. Se ha desarrollado un método para la determinación simultánea de los cationes potasio, bario, calcio, sodio, magnesio, manganeso, níquel, cadmio, litio y cobre mediante electroforesis capilar en 4 minutos de análisis. Se trata de un método analítico sencillo y fiable por lo que resulta muy útil para la realización de análisis rutinarios y de control e

incluso para la detección de contaminación en alimentos con metales pesados.

6. El método propuesto se ha aplicado a muestras de miel separando y cuantificando los cationes potasio, calcio, sodio, magnesio, manganeso, níquel y litio con un sencillo tratamiento de la muestra (dilución y filtración). Es la primera vez que los cationes se determinan en muestras de miel mediante electroforesis capilar.
7. Este método de determinación de cationes mediante electroforesis capilar se ha aplicado también en muestras de vino, zumo, refresco y leche con sencillos tratamientos previos de la muestra.
8. Se ha desarrollado un método analítico para la separación y cuantificación simultánea de los aniones cloruro, nitrato, sulfato, fosfato y ácido fórmico mediante electroforesis capilar en 11 minutos de análisis. Se trata de un procedimiento muy ventajoso por su fiabilidad y sencillez.
9. El método propuesto se ha aplicado en muestras de miel separando y cuantificando los aniones cloruro, nitrato, sulfato, fosfato y ácido fórmico en muestras sometidas únicamente a dilución y filtración. Es la primera vez que se determinan los aniones inorgánicos en miel mediante electroforesis capilar.

✎ Sobre los resultados:

10. En relación con los parámetros físico químicos en las muestras de miel analizadas, los resultados obtenidos concuerdan con los encontrados en la bibliografía consultada.
11. Todas las mieles analizadas poseen una conductividad eléctrica que se encuentra dentro de los límites legales vigentes.
12. Las concentraciones de cationes en la miel obtenidas en las muestras analizadas concuerdan con las observadas en la bibliografía consultada, destacando el alto contenido en cationes que presentan las mieles de *Castanea sativa* Miller.
13. Las concentraciones de aniones obtenidas en las muestras de miel analizadas son comparables con las observadas en la bibliografía consultada.

✎ En cuanto a las relaciones entre los parámetros analizados:

14. Se han encontrado relaciones lineales significativas entre la conductividad eléctrica y el contenido en potasio, entre el contenido total en cationes y el contenido mineral total, entre el contenido en potasio y el contenido total en cationes y entre el contenido en potasio y el contenido mineral total.

✎ Relacionadas con los resultados del análisis multivariante:

15. Los parámetros que más influyen en la clasificación de las mieles en función de su origen botánico, de la procedencia geográfica del envasador o en la diferenciación entre mieles con “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” son los parámetros del color, principalmente, la coordenada tricromática y.
16. Mediante un análisis lineal discriminante llevado a cabo con los 19 parámetros analizados se ha obtenido un modelo capaz de clasificar correctamente el 73,2% de las muestras de miel en función del origen botánico de las mismas. Sería necesario determinar un mayor número de muestras para llevar a cabo un análisis más robusto.
17. Al estudiar la clasificación de las mieles en función de la comunidad autónoma de procedencia del envasador se obtiene un modelo que clasifica correctamente el 83,7% de las muestras analizadas.
18. Mediante el análisis lineal discriminante llevado a cabo con todos los parámetros analizados es posible diferenciar las mieles de Galicia con “Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia” de las procedentes de otras zonas de España con un porcentaje de correcta clasificación del 91,1%.





Anexos





ANEXO I

Determinación simultánea de cationes en miel mediante electroforesis capilar

Journal of Chromatography A. 2005, 1083, 193–198





ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Chromatography A, 1083 (2005) 193–198

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Capillary zone electrophoresis method for the simultaneous determination of cations in honey

Silvia Suárez-Luque, Inés Mato, José F. Huidobro*, Jesús Simal-Lozano

Facultad de Farmacia, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Área de Nutrición y Bromatología, Universidad de Santiago, 15782 Santiago de Compostela (Galicia), Spain

Received 4 November 2004; received in revised form 26 May 2005; accepted 2 June 2005

Abstract

A capillary electrophoresis system for the simultaneous determination of cations in honey samples has been developed. The complete separation and quantification of K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Li^+ , which represent more than 99% of the total content of cations in honey, can be achieved in 4 min with only a dilution and filtration of the honey sample. Electrolyte solution was composed by 10 mM imidazole as the carrier buffer and background absorbance provider and acetic acid as the complexing agent (pH 3.60). The running voltage was +25 kV at 25 °C. Indirect UV detection was achieved at 185 nm. Under the optimum conditions the detection limits ranged from 0.02 to 48.2 mg/kg and the quantification limits have ranged from 0.41 to 48.7 mg/kg. Precision data in honey samples analysed have shown repeatability and reproducibility RSD (%) lower than 2.84 and 6.62%, respectively. Recoveries of cations in honey samples analysed have ranged from 88.5 to 101.8%. These cations were identified by their relative migration times with regard to Ba^{2+} migration time used as reference standard and they were quantified by using an external standard calibration. Twenty-five honey samples were analysed to test the proposed method. Mean contents of 1.22×10^3 , 93, 85, 54, 11, 1.9 and 2.3 mg/kg were found, respectively, for K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Li^+ cations in analysed honeys. These results were similar than the obtained by other authors.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cations; Capillary electrophoresis; Honey

1. Introduction

Honey is a complex matrix which minerals are minority components. The mineral content in floral honeys ranged from 0.020 to 1.028% with an average content of 0.169% [1]. Taking into account cations present in honey, potassium is the predominant and in minor quantity there are calcium, sodium and magnesium. Manganese, copper, iron, nickel, lithium or cadmium are also in honey as trace elements. The mineral and trace element content in honey samples could give an indication of environmental pollution and herewith also an indication of the geographical origin of honey [2]. Latorre et al. [3] determined nine metals in honey samples and they concluded that the metal profile provided enough information

to enable a classification rule to identify honeys, according to their geographical origin. Finally, Terrab et al. [4] also studied minerals of honeys and they obtained good results in the classification of the samples, according to their geographical origin.

Some authors have determined cations in honey by different procedures, like atomic absorption and emission spectroscopy [3,5–10], X-ray fluorescence [11], flame emission photometry [9] or inductively coupled plasma atomic emission spectrometry [4,12–17].

Tacking into account these references, all procedures carried out a mineralization and/or a digestion of the samples previously to their determination except the method of Barisic et al. [11]. Nevertheless, in this method, majority minerals as K^+ , Na^+ or Mg^{2+} , were not determined. These previous treatments of the samples made analytical determinations long and tedious.

* Corresponding author. Fax: +34 981 594912.

E-mail address: qnuidob@usc.es (J.F. Huidobro).

For these reasons the aim of this work is the investigation of the capillary electrophoresis technique for the development of a rapid and simple method for the determination of cations in honey without any treatment of the sample. It was the first time that a capillary electrophoresis method was applied to honey.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Analytical standard-grade K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Li^+ and imidazole were obtained from Sigma. Stock standard solutions were obtained by dissolution of cations in purified water and stored at 4 °C. The water was purified by passage through a Ultra Pure water system Milli-Q plus from Millipore.

Acetic acid and sodium hydroxide pellets were analytical-reagent grade and supplied by Merck.

2.2. Buffers and pH adjustment

Running buffer contained 10 mM imidazole of background electrolyte. The pH was adjusted at a 3.60 value by adding 1 M acetic acid, which is also a complexing agent. The buffer solution was freshly prepared and filtered through a 0.45 μ m membrane.

2.3. Apparatus

Separation was carried out on a Waters Capillary Ion Analyser (CIA System, 1.3 version) equipped with a positive power supply and a UV detector with a 185 nm wavelength filter. Fused-silica capillaries with 75 μ m I.D. and 60 cm in length were used. The distance from the point of injection to the window of on-column detection was 52.5 cm. Electropherograms were collected and plotted by the data acquisition system Millennium 2010 v. 2.15 with specific option CIA for capillary electrophoresis (Waters Associates, Inc. Milford, MA, USA). A Crison micropH 2002 pH meter (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, Spain) and a Selecta Agimatic-S magnetic stirrer (Selecta, Abrera, Barcelona, Spain) were also used. The electrolyte was filtered with membrane filters Phenomenex 0.45 μ m, AFO-0504 (Phenomenex, CA, USA).

2.4. Electrophoretic procedures

Prior to use, new capillaries were treated with the following wash cycle: (i) 10 min with purified water, (ii) 10 min with 1 M NaOH, (iii) 10 min with 10 mM NaOH, (iv) 30 min with purified water and (v) 60 min with the background electrolyte. The (i) and (ii) steps were omitted for daily conditioning of the capillary and, between injections, the capillary was washed with 2 min running electrolyte.

After all analysis of the day, the capillary was also washed with 10 mM NaOH (10 min) and purified water (30 min).

Sample injection was carried out in a hydrodynamic mode during 30 s. The separation run was at a constant voltage of +25 kV at 25 °C and it is achieved in 4 min. Indirect UV detection was achieved at 185 nm.

2.5. Samples

This work was carried out on 25 samples from Galicia (Northwestern Spain) labelled as "Indicación Xeográfica Protexida-Mel de Galicia". The samples were stored in darkness at room temperature until analysis. These samples were classified according to their colour determined by the method of Brice et al. [18], in light and dark honeys. Light honeys were considered water white, extra white and white honeys and extra light amber, light amber and amber of Brice et al. classification had correspondence with dark honeys. This method is Official in the AOAC [19]. The samples were also classified according to their geographical origin in the four Galician regions.

For the electrophoretic analysis 1 g of honey was dissolved in 10 ml of purified water, filtered through a 0.45 μ m membrane and injected directly without any other sample treatment. Each sample was injected in triplicate. This amount of honey (1 g/10 ml) was the greatest quantity to obtain a good response without interferences.

All standards and samples were injected in triplicate. All statistical analysis were made with Statgraphics [20].

3. Results and discussion

First of all, working with standard solutions, 10 cations (K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Li^+ and Cu^{2+}) were separated and identified by the present electrophoretic method. When this method was applied to honey samples K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Li^+ cations were identified and quantified (Fig. 1), which represent more than 99% of the total content of total cations [1]. These cations were identified by comparison of the relative migration times of their peaks with the Ba^{2+} migration time used as reference compound. These cations were quantified by using an external standard calibration.

3.1. Detection and quantification limits

The detection limit was calculated as $s_b + 3s$, where s_b is the average signal of 10 blank injections (absolute area value of each cation migration time $\pm 1\%$) and s the standard deviation. The quantification limit was calculated as $s_b + 10s$, where s_b is the average signal of 10 blank injections and s the standard deviation [21]. The detection limits ranged from 0.02 mg/kg for Li^+ to 48.2 mg/kg for K^+ and the quantification limits ranged from 0.41 mg/kg for Ni^{2+} to 48.7 mg/kg for K^+ .

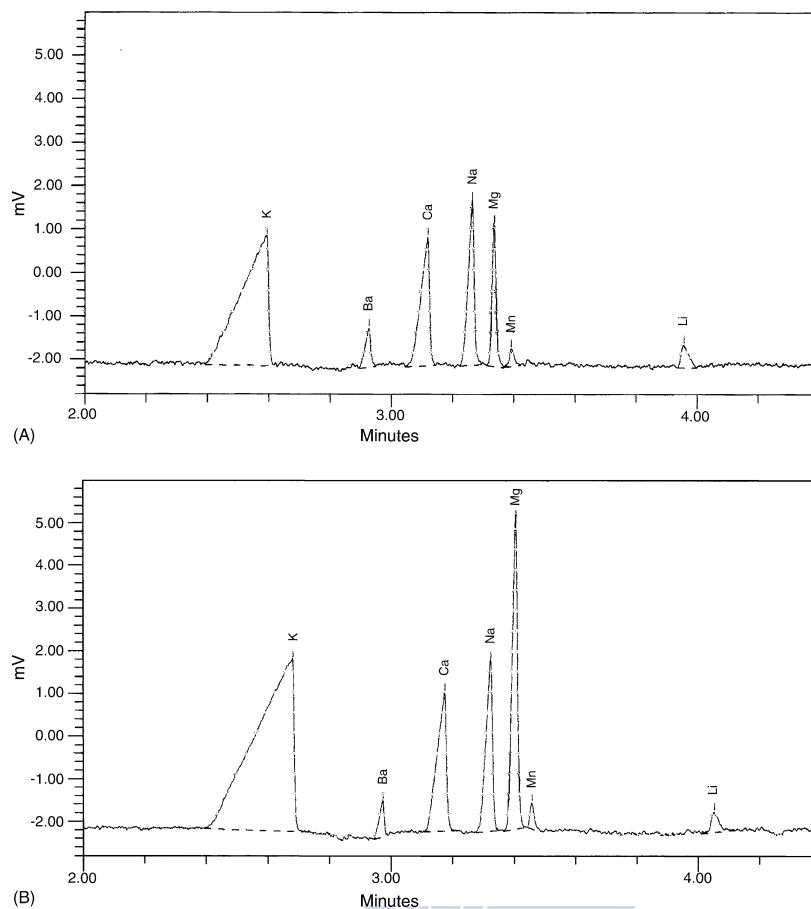


Fig. 1. Electropherograms of analysed cations by the proposed method in a light honey (A) and a dark honey (B). Ba^{2+} was added as reference compound for the calculation of the relative migration times.

3.2. Calibration curves

Calibration curves were determined for several different concentrations of a mixture of cations standard solutions. Each calibration sample was injected in triplicate. Plotting concentration against peak area and applying the least squares method obtained calibration graphs for each compound. Each plot was linear in a wide interval from quantification limits to 10 g/kg for K^+ , 200 mg/kg for Ca^{2+} , 400 mg/kg for Na^+ and Mg^{2+} , 100 mg/kg for Mn^{2+} and Ni^{2+} and to 50 mg/kg for Li^+ . A regression analysis with each cation was made. A p -value in the ANOVA test of 0.0000 was obtained for all cations. Since the p -value is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between area and concentration at the 99% confidence level.

Table 1

Recoveries (%) obtained with the method of standard additions for analysed cations and p -value from ANOVA test for the comparison of the slopes of regression lines obtained when matrix effect was studied

Cation	Recovery (%) \pm SD	p -Value
K^+	96.7 \pm 2.5	0.8209
Ca^{2+}	100.4 \pm 1.2	0.5368
Na^+	100.5 \pm 1.1	0.2223
Mg^{2+}	100.9 \pm 1.8	0.1535
Mn^{2+}	101.8 \pm 3.3	0.2603
Ni^{2+}	88.5 \pm 2.9	0.7322
Li^+	99.7 \pm 1.7	0.2423

Table 2
Cations content (mg/kg) of analysed honeys

No. of sample	Geographical origin	Colour	Cation (mg/kg)						
			K ⁺ (× 10 ³)	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Ni ²⁺	Li ⁺
1	A Coruña	Light	0.68	109	102	21	12	ND	1.6
2	A Coruña	Light	0.70	92	64	22	10	ND	2.0
3	A Coruña	Light	0.76	88	75	22	8.0	ND	2.8
4	A Coruña	Light	0.62	91	154	22	5.5	ND	NQ
5	A Coruña	Dark	0.78	89	45	17	11	ND	1.3
6	A Coruña	Dark	0.80	90	81	20	6.4	ND	2.0
7	Lugo	Dark	0.95	62	64	27	6.0	ND	3.2
8	Lugo	Dark	0.81	179	219	25	8.1	ND	1.4
9	Lugo	Dark	0.86	60	166	20	ND	ND	2.4
10	Lugo	Dark	0.50	50	90	36	7.0	ND	ND
11	Lugo	Dark	0.79	75	221	19	3.8	0.3	NQ
12	Lugo	Dark	0.61	56	68	18	2.3	1.5	1.8
13	Lugo	Dark	0.99	76	91	35	6.7	ND	1.8
14	Lugo	Dark	1.20	87	53	56	11	ND	1.8
15	Lugo	Dark	1.40	101	67	52	11	ND	2.8
16	Ourense	Dark	2.33	146	26	209	7.9	ND	3.2
17	Ourense	Dark	2.53	125	31	204	6.3	ND	2.9
18	Ourense	Dark	1.87	88	40	130	8.1	ND	0.93
19	Ourense	Dark	1.31	62	87	27	7.8	ND	3.6
20	Ourense	Dark	4.38	106	39	69	29	ND	2.2
21	Ourense	Dark	1.89	136	47	205	51	ND	2.1
22	Pontevedra	Light	0.66	116	56	18	13	ND	NQ
23	Pontevedra	Dark	0.97	77	101	20	4.5	ND	2.1
24	Pontevedra	Dark	1.47	76	67	41	12	4.7	3.6
25	Pontevedra	Dark	0.74	89	72	22	18	1.1	ND
Mean			1.22	93	85	54	11	1.9	2.3
SD			0.85	30	52	62	10	2.0	0.77
V _{min}			0.50	50	26	17	2.3	0.25	0.93
V _{max}			4.38	179	221	209	51	4.7	3.6

ND: not detectable. NQ: not quantifiable.

3.3. Precision

The precision study has comprised repeatability and reproducibility assays. They were developed in three different honeys, which contained low, medium and high cations levels. The repeatability was established by injecting five times the same honey. The reproducibility was determined by

analysing each sample of honey on three different days over about one month.

3.3.1. Migration times

When a capillary electrophoresis analytical method is developed, a common problem is the great variation in the absolute migration times [22]. A possible solution was the

Table 3
Cations content (mg/kg) obtained by other authors

Author	Cation (mg/kg)						
	K ⁺ (× 10 ³)	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Ni ²⁺	Li ⁺
[1]	0.94 (0.10–4.7)	50 (5–266)	47 (6–400)	27 (7–126)	2.2 (0.2–9.5)	–	–
[5]	0.65 (0.19–1.12)	88 (56–120)	98 (63–133)	38 (3–73)	21 (19–23)	–	–
[6]	1.34 (0.68–2.01)	–	115 (62–168)	77 (34–120)	5 (2–8)	<0.2	0.05 (0.02–0.08)
[7]	0.47 (0.44–0.50)	48 (41–54)	96 (90–102)	37 (33–41)	3.0 (2.6–3.4)	–	–
[8]	0.68 (0.05–6.78)	120 (51–420)	87 (22–476)	55 (7–173)	3.9 (0.4–45)	0.23 (0.01–3.37)	–
[10]	–	192 (15–654)	–	71 (7–547)	11 (0–214)	0.99 (ND–1.70)	0.27 (0.15–1.20)
[11]	–	66 (22–110)	–	–	0.8 (0.1–1.4)	0.05 (0–0.10)	–
[12]	0.66 (0.13–2.16)	–	–	76 (36–220)	0.7 (0.1–2.0)	–	–
[13]	1.03 (0.15–3.89)	–	–	130 (68–166)	30 (4–58)	–	–
[14]	0.43 (0.07–1.81)	–	–	105 (24–324)	2.0 (0.3–5.0)	–	–
[15]	0.22 (0.21–0.89)	124 (61–280)	–	35 (11–90)	0.8 (0.2–2.0)	–	–
[17]	0.68 (0.14–2.61)	181 (110–248)	389 (256–501)	77 (37–139)	–	–	–

Mean (V_{Min} – V_{Max}).

use of relative migration times respect to a reference compound [23,24]. Ba^{2+} was used as reference compound for the identification of cations in honey samples because it was not present in honey samples at the detection limit of this method. In the study of precision of migration times better results were obtained for relative migration times. The relative standard deviations (RSD%) of the repeatability and the reproducibility were ≤ 0.44 and ≤ 0.56 for relative migration times and ≤ 1.55 and $\leq 2.27\%$ for absolute migration times.

3.3.2. Honey content

The relative standard deviations (RSD%) of the repeatability and the reproducibility were ≤ 2.84 and $\leq 6.62\%$. For areas, a one-way analysis of variance was performed to test whether there were significant differences between duplicates of injection triplicates and repetitions (five for repeatability and three for reproducibility). If the p -value of the F -test was greater than 0.05, there was not a statistically significant difference at 95% confidence level. All p -values studied were greater than 0.05 so we can conclude that precision is good for the determination of cations in honey samples by the proposed method.

3.4. Recovery

We have established the accuracy of the cation analysis by using the method of standard additions. Different amounts of each cation standards were added to equal volumes of the sample and then diluted to the same volume. Table 1 lists the percentage of recoveries obtained for each cation. Furthermore, to test whether there was a matrix effect, recovery assay must be analysed with different concentrations of sample. If regression lines obtained from the comparison of recoveries were parallel, we can conclude that there was not a matrix effect. Honey samples at two different concentrations were analysed and parallel lines were tested with the analysis of the slopes of the regression lines with an ANOVA test. If the p -value for the slopes was greater than 0.10 (Table 1), statistically significant differences among the slopes for the various volumes of sample at the 90% or higher confidence level were not found. Therefore, there was not a matrix effect for the determination of cations in honey samples by the proposed method.

3.5. Content of cations of honeys analysed

The cations content of 25 honey samples analysed is shown in Table 2. Table 3 summarizes results obtained by other authors [1,5–8,10–15,17]. As you can see these results are close to those obtained in this work in all cases except for Li^+ , which we obtained higher results. However, two authors only determined this cation and they have obtained very different results between them.

Fig. 1 shows electropherograms of a light and a dark honey. A variability in the quantitative composition of cations was found in honeys. This variability could have any relation with

the colour of the honeys because the content of K^+ , Na^+ , Mg^{2+} and Li^+ cations were greater in dark honeys and Ni^{2+} cation was only detected in dark samples. Results obtained for Ca^{2+} and Mn^{2+} were similar in both honey types.

Tacking into account the geographical origin of the samples an important variability in honey cations content was found too. To test whether this variability was significantly an one-way ANOVA test was made with each component and results different statistically significant were found for K^+ , Mg^{2+} and Mn^{2+} . We have made then a multiple range test (Fisher's least significant difference procedure) for these

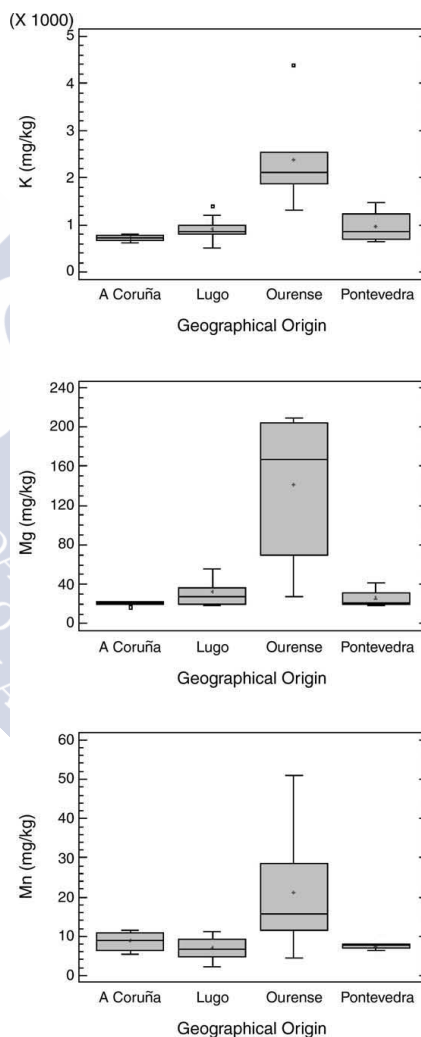


Fig. 2. Box and Whiskers plots of the content of K^+ , Mg^{2+} and Mn^{2+} cations in honey samples analysed classified, according to their geographical origin (95% confidence level).

cations in order to know which regions could be differentiated and results showed that honey samples from Orense region could be identified at the 95% confidence level. Fig. 2 shows the Box and Whiskers plots of these three cations contents classified, according to their geographical origin.

4. Conclusions

The proposed method allows the separation and quantification of cations K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Li^+ in honey samples by capillary electrophoresis in 4 min of analysis for the first time. These cations represent more than 99% of the total content of cations in honey. The electrophoretic analysis was simple, rapid and did not require any other preparation of sample than dilution and filtration. It means a great improvement in the determination of cations in honey samples because a calcination of the samples is not necessary and it could be useful for routine analysis. The cation contents of honey could be used to establish the geographical origin of samples.

Acknowledgements

We thank Professor Rafael Cela Torrijos of the Analytical Chemistry Department of the Chemistry Faculty and Professor Juan Carlos García Monteagudo of the Chemistry-Physics Department of the Pharmacy Faculty both of University of Santiago de Compostela for their helpful comments. We thank all of the beekeepers that provided the "Indicación Xeográfica Protexida-Mel de Galicia" honey samples for this study.

References

- [1] J.W. White Jr., Honey (Advances in Food Research), vol. 24, Academic Press, New York, 1978.
- [2] E. Anklam, Food Chem. 4 (1998) 549.
- [3] M.J. Latorre, R. Peña, S. García, C. Herrero, Analyst 125 (2000) 307.
- [4] A. Terrab, A.G. Gustavo, M.J. Díez, F.J. Heredia, J. Sci. Food Agric. 83 (2002) 637.
- [5] J.L. Rodríguez-Otero, P. Paseiro, J. Simal, L. Terradillos, A. Cepeda, J. Apic. Res. 31 (2) (1992) 65.
- [6] M.J. Latorre, R. Peña, C. Pita, A. Botana, S. García, C. Herrero, Food Chem. 66 (1999) 263.
- [7] M.E. Contí, Food Contr. 11 (2000) 459.
- [8] A.M. González Paramás, J.A. Gómez, R.J. García-Villanova, T. Rivas, R. Ardanuy, J. Sánchez, J. Sci. Food Agric. 80 (1) (2000) 157.
- [9] P. Przybylowski, A. Wilczynska, Food Chem. 74 (2001) 289.
- [10] J. Devilliers, J.C. Doré, M. Marengo, F. Poirier-Duchene, N. Galand, C. Viel, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 5998.
- [11] D. Barisic, A. Vertacnik, J.J. Bromenshenk, N. Kezic, S. Lulic, M. Hus, P. Kraljevic, M. Simpraga, Z. Seletkovic, Apidologie 30 (1999) 277.
- [12] M.J. Díez, C. Andrés, A. Terrab, Int. J. Food Sci. Technol. 39 (2004) 167.
- [13] A. Terrab, M.J. Díez, F.J. Heredia, Int. J. Food Sci. Technol. 38 (2003) 379.
- [14] A. Terrab, M.J. Díez, F.J. Heredia, Int. J. Food Sci. Technol. 38 (2003) 387.
- [15] A. Terrab, M.J. Díez, F.J. Heredia, Int. J. Food Sci. Technol. 38 (2003) 395.
- [16] A. Terrab, D. Hernanz, F.J. Heredia, J. Agric. Food Chem. 52 (11) (2004) 3441.
- [17] A. Terrab, A.F. Recamales, D. Hernanz, F.J. Heredia, Food Chem. 88 (2004) 537.
- [18] B.A. Brice, A. Turner, J.W. White Jr., J. Assoc. Agric. Chem. 39 (4) (1956) 919.
- [19] Official Method 960.44, Color classification of honey, Official Methods of Analysis of AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA, 2000, p. 22, Chapter 44.
- [20] Statgraphics Plus for Windows 4.0. 1999. Statistical Graphics Corp.
- [21] ACS Committee on Environmental Improvement. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. Anal. Chem. 52 (1980) 2242.
- [22] J. Yang, S. Bose, D.S. Hage, J. Chromatogr. A 735 (1996) 209.
- [23] D.N. Heiger, High Performance Capillary Electrophoresis. Introduction, Second ed., Hewlett Packard, France, 1992.
- [24] W.R. Jones, J. Chromatogr. 640 (1993) 387.



ANEXO II

Método de electroforesis capilar para la determinación rápida de cationes metálicos en bebidas

Talanta. 2006, 68, 1143–1147



Rapid capillary zone electrophoresis method for the determination of metal cations in beverages

Silvia Suárez-Luque, Inés Mato, José F. Huidobro*,
Jesús Simal-Lozano

*Facultad de Farmacia, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Área de Nutrición y Bromatología,
Universidad de Santiago, 15782 Santiago de Compostela (Galicia), Spain*

Received 24 February 2005; received in revised form 14 June 2005; accepted 14 July 2005
Available online 2 September 2005

Abstract

A rapid and reliable capillary zone electrophoresis method for the determination of inorganic cations was developed. The complete separation of K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Li^+ and Cu^{2+} can be achieved in 4 min with a simple electrolyte composed by 10 mM imidazole as the carrier buffer and background absorbance provider and acetic acid as the complexing agent (pH 3.60). Injection was performed hydrostatically by elevating the sample at 10 cm for 30 s. The running voltage was +25 kV at room temperature. Indirect UV-absorption detection was achieved at 185 nm. The detection limit was in the range between 0.06 mg/l (Mg^{2+}) and 0.57 mg/l (K^+) and the quantification limits ranged from 0.10 mg/l (Ni^{2+}) to 0.80 mg/l (Cu^{2+}). The calibration graphs were linear in the concentration range from the quantification limit till at least 1 g/l in K^+ , 10 mg/l in Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} , 40 mg/l in Na^+ and 12 mg/l in Li^+ and Cu^{2+} . The repeatability, intraday and interday analysis were $\leq 1.55\%$ and $\leq 3.64\%$ for migration time and $\leq 3.38\%$ and $\leq 3.63\%$ for peak area. The method developed has been applied to several beverage samples with only a simple dilution and filtration treatment of the sample. The proposed method is simple, fast, cheap and it is achieved with common products in either laboratory. For these reasons, it is a very useful method for routine analysis.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Metal cations; Capillary zone electrophoresis; Beverages

1. Introduction

Capillary zone electrophoresis is one of the more powerful separation techniques for the analysis of a wide variety of sample matrices [1–3]. The advantages of ion analysis using this technique include resolution, speed, simplicity and reduced sample preparation. Hjertén [4] first reported the application of capillary electrophoresis with indirect detection for the analysis of inorganic and organic anions. From this work, a variety of application areas for capillary electrophoresis have been developed based on various separation principles.

Beck and Engelhardt [5] first proposed imidazole as a chromophore co-ion of the electrolyte for separation of metal cations. They investigated several background carrier electrolytes for indirect UV-absorption detection and found imidazole to be suitable for the separation of metal ions, amines and amino alcohols. Their results proved the applicability of this running electrolyte in routine analysis. Table 1 summarizes some electrophoretic methods published with imidazole as background electrolyte and indirect UV-absorption detection.

Some electrophoretic methods used imidazole as background electrolyte for the determination of cations in food samples. Beck and Engelhardt [5], Quang and Khaledi [6], Pansar et al. [7] and Shakulashvili et al. [8] applied their methods to cation analysis in water samples and Yang et al. [9] developed a method for K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} and

* Corresponding author. Tel.: +34 981 594626; fax: +34 981 594912.
E-mail address: qnuidob@usc.es (J.F. Huidobro).

Table 1

Some electrophoretic methods published with imidazole as background electrolyte and indirect UV-absorption detection

Metal cations analysed	Electrolyte composition	pH	Separation time (min)	Sample	Reference
K ⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , Ni ²⁺ , Cd ²⁺ , Co ²⁺ , NH ₄ ⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺	10 mM imidazole, 0.5% acetic acid	4.32	20	Water, human plasma	[2]
K ⁺ , Ba ²⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , Li ⁺	5 mM imidazole, H ₂ SO ₄	4.5	4	Water	[5]
K ⁺ , Ba ²⁺ , Sr ²⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ , Cd ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Li ⁺ , Zn ²⁺ , Cu ⁺	6 mM imidazole, 12 mM α -hydroxyisobutyric acid, acetic acid	3.95	4	Water	[6]
K ⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺	5 mM imidazole, 6.5 mM α -hydroxyisobutyric acid, 2 mM 18-crown-6 ether	4.1	5.5	Water	[7]
K ⁺ , Ba ²⁺ , Sr ²⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ , Cd ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Li ⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Cr ²⁺	10 mM imidazole, 13 mM glycolic acid	4.32	20	Water	[8]
K ⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺	5 mM imidazole, 0.5 M H ₂ SO ₄	4.5	3	Electrolyte solutions, apple juice, orange juice	[9]
NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Ba ²⁺ , Sr ²⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ , Li ⁺ , Zn ²⁺ , Cu ⁺ , Cr ²⁺	5 mM imidazole, 6.5 mM α -hydroxyisobutyric acid, 0.53 mM 18-crown-6 ether, MeOH 20%	4.5	12	Chinese tea infusions	[10]
Cs ²⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Ba ²⁺ , Sr ²⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ , Cd ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Li ⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺	10 mM imidazole, 5 mM lactic acid, 0.5 mM 18-crown-6 ether	4.5	5	No application	[19]
Cs ²⁺ , K ⁺ , Ba ²⁺ , Sr ²⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ , Cd ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Li ⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Cr ²⁺	Pyridine or imidazole with glycolic acid	4.0	15	Water, food soil	[20]
K ⁺ , Ba ²⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , Li ⁺	Imidazole with several complexing agents	Several pH values	Several times	No application	[21]

Cu²⁺ determination in apple juice and orange juice samples. Later, Yang et al. [10] proposed other method with a more complex electrolyte composition that was applied to Chinese tea infusions. Other background electrolytes were also used for the determination of cations in beverages. For instance, Weston and Brown [11] applied an electrophoretic method with background electrolyte based on 5 mM UVCat-1, 6.5 mM α -hydroxyisobutyric acid at pH 4.4 with indirect UV-absorption detection to determine K⁺, Ca²⁺, Na⁺, Mg²⁺ and Cu²⁺ in a commercial orange juice. After that, Núñez et al. [12] analysed K⁺, Ca²⁺, Na⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ and Li⁺ in wines with a background electrolyte composed by UVCat-1, α -hydroxyisobutyric acid and 18-crown-6 ether at pH 4.5 and indirect UV-absorption detection.

Apart from these references, several excellent reviews offer extensive lists of the capillary electrophoresis methods for cation analysis [1,3,13–16].

The determination of metal cations in beverages is important because they have influence on the organoleptic properties of foods (Núñez et al. [12]). This determination is usually made in a food quality control laboratory to study the nutritional value of some foodstuffs.

Then, this paper aim has been to optimize the parameters to obtain a simple and rapid capillary zone electrophoresis method for the determination of main metal cations in beverage samples for routine analysis.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Analytical standard-grade K⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Na⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺, Li⁺, Cu²⁺ and imidazole were obtained from Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Stock standard solutions were obtained by dissolution of metal cations in Milli-Q water and stored at 4 °C. The Milli-Q water was purified by passage through a Compact Milli-RO and Milli-Q water system from Millipore, Milford, MA, USA.

Acetic acid and sodium hydroxide pellets were analytical-reagent grade and supplied by Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

2.2. Buffers and pH adjustment

Running buffer contained 10 mM imidazole of background electrolyte. The pH was adjusted at 3.60 by adding 1 M acetic acid. The buffer solution was freshly prepared and filtered through a 0.45 μ m membrane.

2.3. Apparatus

Separation was carried out on a Waters Capillary Ion Analyser (CIA System, 1.3 Version) equipped with a positive

power supply and an UV detector with a 185 nm wavelength filter. Fused-silica capillaries with 75 μm i.d. and 60 cm in length were used (Waters Associates Inc., Milford, MA, USA). The distance from the point of injection to the window of on-column detection was 52.5 cm. Electropherograms were collected and plotted by the data acquisition system Millennium 2010 v. 2.15 with specific option CIA for capillary zone electrophoresis. A Crison micropH 2002 pH meter (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, Spain) and a Selecta Agimatic-S magnetic stirrer (Selecta, Abrera, Barcelona, Spain) were also used. The electrolyte was filtered with membrane filters Phenomenex 0.45 μm , AFO-0504 (Phenomenex, CA, USA).

2.4. Electrophoretic procedure

Prior to use, new capillaries were treated with the following wash cycles: (i) 10 min with Milli-Q water, (ii) 10 min with 1 M NaOH, (iii) 10 min with 10 mM NaOH, (iv) 30 min with Milli-Q water and (v) 60 min with the background electrolyte. The (i) and (ii) steps were omitted for daily conditioning of the capillary and between injections, the capillary was washed 2 min with running electrolyte.

After the analysis of the day, the capillary was washed with 10 mM NaOH (10 min) and Milli-Q water (30 min).

Injection was performed hydrostatically by elevating the sample at 10 cm for 30 s. The separation run was carried out in 4 min at a constant voltage of +25 kV (current 25 μA) and at room temperature. The detection mode was indirect UV-absorption at 185 nm. Injections were made in triplicate.

2.5. Samples

The proposed method was applied to several beverages, as red wine, white wine, peach and apple juice, grape and pineapple juice, orange juice and orange soft drink. These samples were purchased at a local supermarket. 1 ml of sample was dissolved in 100 ml of Milli-Q water, filtered through 0.45 μm membrane and injected directly without any other sample treatment.

3. Results

The proposed method allowed the identification and quantification of K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Li^+ and Cu^{2+} in several beverage samples. These metal cations were identified by comparison of their migration times with those of standards and they were quantified by using an external standard calibration with peak area. Evaluation of peak area is recommended for analysis where high concentrations of analyte are expected and electromigration dispersion cannot be eliminated (Sustacek et al. [17]). Table 2 shows the migration times of cations analysed. In Fig. 1, an electropherogram with the complete separation of the cations studied in proposed conditions is shown.

Table 2

Migration times ($n=3$), detection and quantification limits and correlation coefficients (r) of calibration plots of metal cations analysed in the proposed method

Cation	Migration time (min) \pm S.D.	Detection limit (mg/l)	Quantification limit (mg/l)	r
K^+	2.40 ± 0.06	0.57	0.62	0.9993
Ba^{2+}	2.84 ± 0.08	0.37	0.50	0.9991
Ca^{2+}	2.99 ± 0.08	0.12	0.18	0.9996
Na^+	3.15 ± 0.09	0.12	0.17	0.9992
Mg^{2+}	3.23 ± 0.10	0.06	0.16	0.9992
Mn^{2+}	3.28 ± 0.10	0.11	0.13	0.9965
Ni^{2+}	3.31 ± 0.10	0.07	0.10	0.9993
Cd^{2+}	3.53 ± 0.12	0.16	0.25	0.9998
Li^+	3.75 ± 0.13	0.11	0.14	0.9988
Cu^{2+}	3.98 ± 0.15	0.53	0.80	0.9983

3.1. Detection and quantification limits

The detection limit (LOD) was calculated as $s_b + 3s$, where s_b is the average signal of 10 blank injections (absolute area value of each cation migration time $\pm 1\%$) and s the standard deviation. The quantification limit (LOQ) was calculated as $s_b + 10s$, where s_b is the average signal of 10 blank injections and s the standard deviation (ACS Committee on Environmental Improvement [18]). The LOD ranged from 0.06 mg/l for Mg^{2+} to 0.57 mg/l for K^+ and the LOQ ranged from 0.10 mg/l for Ni^{2+} to 0.80 mg/l for Cu^{2+} (Table 2).

3.2. Calibration curves

Calibration curves were determined for seven different concentrations of a mixture of cations standard solutions. Each calibration sample was injected in triplicate. Calibration graphs were obtained plotting concentration against peak area and applying the least squares method. Table 2 lists the correlation coefficients of these calibration plots which were linear in a wide interval from the quantification limit till at

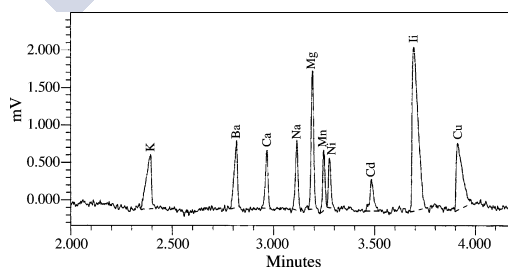


Fig. 1. Separation of metal cations of a standard mixture solution, when the developed electrophoretic method was applied (10 mM imidazole and acetic acid, pH 3.60, +25 kV, room temperature, indirect UV-absorption detection, 185 nm; K^+ , Ba^{2+} and Cu^{2+} : 5 mg/l; Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} and Li^+ : 1 mg/l).

Table 3
Precision results in R.S.D. (%) of metal cations analysed by the proposed method

Cation	Intraday (<i>n</i> = 5)		Interday (<i>n</i> = 3)	
	Migration time	Peak area	Migration time	Peak area
K ⁺	0.79	1.07	2.27	1.82
Ba ²⁺	1.01	0.81	2.64	1.52
Ca ²⁺	1.08	1.05	2.77	1.03
Na ⁺	1.17	1.19	2.89	1.18
Mg ²⁺	1.19	1.30	2.97	1.16
Mn ²⁺	1.23	2.51	3.02	3.63
Ni ²⁺	1.24	1.43	3.04	1.34
Cd ²⁺	1.33	2.31	3.26	2.63
Li ⁺	1.46	1.73	3.43	1.35
Cu ²⁺	1.55	3.38	3.64	3.01

least 1 g/l in K⁺, 10 mg/l in Ba²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ and Cd²⁺, 40 mg/l in Na⁺ and 12 mg/l in Li⁺ and Cu²⁺.

3.3. Precision

Repeatability (interday and intraday) was studied to obtain the method precision. Intraday analysis was established by the injection of the standard mixture of cations five times at the same day. Interday repeatability was determined by analysing the standard mixture on 3 different days. Table 3 shows the results of the precision of migration time and peak area. The relative standard deviations (R.S.D., %) of the intraday and the interday studies are ≤1.55% and ≤3.64% for migration time and ≤3.38% and ≤3.63% for peak area, respectively. The variation of migration time could be reduced by the calculation of relative migration times with the addition of a reference compound.

3.4. Samples

The proposed method was applied to the analysis of cations in samples of red wine, white wine, peach and apple juice, grape and pineapple juice, orange juice and orange soft drink (Table 4). Fig. 2 shows an electropherogram of the separation of the cations analysed of grape and pineapple juice. K⁺, Ca²⁺, Na⁺ and Mg²⁺ were found in all samples. Orange juice had the most number of quantified cations and peach and apple juice had the most content of quantified cations. Traces of Ni²⁺ were found in orange juice. So this method could be used for the detection of food contamination by heavy metals.

Table 4
Metal cations concentration (mg/l) obtained when the proposed method was applied to beverage samples

	K ⁺	Ba ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Ni ²⁺
Red wine	16.11	–	1.54	0.78	1.12	–	–
White wine	14.34	–	0.98	0.63	0.96	–	–
Peach and apple juice	19.30	–	1.06	0.89	0.89	–	–
Grape and pineapple juice	18.11	–	2.20	1.15	1.69	0.23	–
Orange juice	21.82	0.94	0.89	0.39	1.11	–	0.14
Orange soft drink	7.01	0.55	1.23	0.30	–	–	–

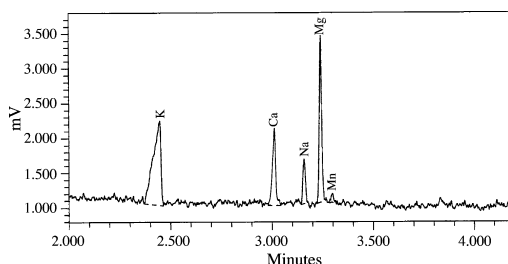


Fig. 2. Electropherogram of metal cations separated in a grape and pineapple juice sample with the proposed method.

4. Discussion

The most efficient background electrolyte in the separations of alkali and alkaline earth cations was imidazole because its electrophoretic mobility is close to those of metal cations. Imidazole was also a visualization agent in capillary zone electrophoresis with indirect UV-absorption detection (François et al. [19]). Lee and Lin [20] determined the mobility of imidazole, pyridine and benzyl amine as the background electrolyte. They concluded that the mobility of imidazole matched best with the alkali and alkaline earth metal ions and these ions were better separated in this buffer. Therefore, we selected imidazole as the best background electrolyte. The effect of imidazole concentration was studied in the 5–20 mM range by maintaining a constant pH value of 3.60. We have observed that if imidazole concentration was greater, the migration times of the cations were higher. A 10 mM imidazole concentration was selected as the optimum because the separation of the cations is the best in a short analysis time. Tacking into account the influence of background electrolyte complexing agent, Lin et al. [21] noted that the acid added to adjust the buffer pH affected the resolution and the migration order of the ions. If HCl was used to adjust the pH, Na⁺ and Mg²⁺ overlapped. They also explain that acetic, glycolic, lactic acids and α-hydroxyisobutyric acid affected the cations separation in a similar way. Acetic acid is the most common acid so we selected it for pH adjustment.

On the other hand, the resolution at the baseline level and the cations separation were influenced by the pH (Lin et al. [21]). For this reason, the effect of the pH value was studied in a 3.50–5.00 range. We saw that the higher pH the faster migration times. Values up to 3.60 overlapping occurred and

also values up to 4.50 Cu^{2+} cannot be detected. Then, a 3.60 pH value was selected. Although, this pH value is out of the buffering region of both BGE components, we have selected anyway in order to improve cations sensibility and determine as much cations as possible.

Finally, the effect of voltage on separation and resolution has been studied. When voltage was increased, the analysis time was decreased but the complete separation of the analytes could be accomplished. Voltage of +25 kV was chosen because of the good separation of the cations in 4 min of analysis.

5. Conclusions

A rapid, simple and reliable capillary zone electrophoresis method for the determination of metal cations K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Li^+ and Cu^{2+} was developed in 4 min. The composition of background electrolyte was 10 mM imidazole as visualisation agent and acetic acid (1 M) as the complexing agent and to adjust the pH at 3.60. The running voltage was +25 kV at a room temperature. This method was applied to different beverage samples and only a simple treatment of dilution and filtration was necessary. The proposed method is simple, fast, cheap and it is achieved with common products in either laboratory. For these reasons, it is very useful method for routine analysis and for the detection of food contamination by heavy metals.

Acknowledgements

We thank Professor Rafael Cela Torrijos of the Analytical Chemistry Department of the Chemistry Faculty

and Professor Juan Carlos García Monteagudo of the Chemistry-Physics Department of the Pharmacy Faculty both of University of Santiago de Compostela for their helpful comments.

References

- [1] A.R. Timervaev, *Electrophoresis* 23 (2002) 3884.
- [2] F. Qu, J.M. Lin, Z.L. Chen, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 217.
- [3] A.R. Timervaev, *Electrophoresis* 25 (2004) 4008.
- [4] S. Hjertén, *Chromatogr. Rev.* 9 (1967) 122.
- [5] W. Beck, H. Engelhardt, *Chromatographia* 33 (1992) 313.
- [6] C. Quang, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A* 659 (1994) 459.
- [7] M. Pantisar, P.K. Kallio, G. Manninen, *Anal. Chim. Acta* 314 (1995) 67.
- [8] N. Shakulashvili, T. Faller, H. Engelhardt, *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 205.
- [9] Q. Yang, M. Jimidar, T.P. Hamoir, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A* 673 (1994) 275.
- [10] Q. Yang, J. Smeyers-Verbeke, W. Wu, M.S. Khots, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A* 688 (1994) 339.
- [11] A. Weston, P.R. Brown, *J. Chromatogr.* 602 (1992) 249.
- [12] M. Nuñez, R.M. Peña, C. Herrero, S. García, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 183.
- [13] P. Blatny, F. Kvasnicka, *J. Chromatogr. A* 834 (1999) 419.
- [14] J.S. Fritz, *J. Chromatogr. A* 884 (2000) 261.
- [15] R. Timerbaev, O.A. Shpigun, *Electrophoresis* 21 (2000) 4179.
- [16] J. Sadecka, J. Polonsky, *J. Chromatogr. A* 880 (2002) 243.
- [17] V. Sustacek, F. Foret, P. Bocek, *J. Chromatogr.* 545 (1991) 239.
- [18] ACS Committee on Environmental Improvement, *Anal. Chem.* 52 (1980) 2242.
- [19] C. François, Ph. Morin, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* 717 (1995) 393.
- [20] Y.-H. Lee, T.-I. Lin, *J. Chromatogr. A* 675 (1994) 227.
- [21] T.-I. Lin, Y.-H. Lee, Y.-C. Chen, *J. Chromatogr. A* 654 (1993) 167.





ANEXO III

Determinación de los cationes metálicos mayoritarios en leche mediante electroforesis capilar

International Dairy Journal. 2007, 17, 896–901



Determination of major metal cations in milk by capillary zone electrophoresis

Silvia Suárez-Luque, Inés Mato, José F. Huidobro*, Jesús Simal-Lozano

Facultad de Farmacia, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Área de Nutrición y Bromatología, Universidad de Santiago, 15782 Santiago de Compostela (Galicia), Spain

Received 16 July 2006; accepted 18 December 2006

Abstract

A reliable and rapid capillary zone electrophoresis method for the determination of the major of cations in milk samples was developed. Sample preparation consisted of dilution, acidification to pH 4.0 with 1 mol L^{-1} acetic acid and filtration. The complete separation of K^+ , Ca^{2+} , Na^+ and Mg^{2+} could be achieved in 4 min with a simple electrolyte composed of 10 mmol L^{-1} imidazole and 1 mol L^{-1} acetic acid (pH 3.6). The running voltage was 25 kV at 25°C . Indirect UV detection was achieved at 185 nm. Detection limits ranged from 0.06 to 0.57 mg L^{-1} and quantification limits ranged from 0.16 to 0.62 mg L^{-1} . Precision data showed relative standard deviations (RSD%) lower than 4.1% for relative migration time and 2.4% for milk concentrations, respectively. Recoveries of cations in samples analysed ranged from 97.7% to 101.1%. Thirty samples of milk were analysed, obtaining mean values of 1.46, 1.19, 0.505 and 0.126 g L^{-1} for K^+ , Ca^{2+} , Na^+ and Mg^{2+} , respectively.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Major metal cations; Capillary zone electrophoresis; Milk

1. Introduction

The major cations found in milk samples are K^+ , Ca^{2+} , Na^+ and Mg^{2+} . K^+ and Na^+ are only found as soluble ions; in contrast, Ca^{2+} and Mg^{2+} are found in milk as soluble ions, as salts or associated with casein micelles. K^+ is the predominant cation in milk samples, with a mean content of 1.5 g L^{-1} , followed by Ca^{2+} (1.2 g L^{-1}), Na^+ (0.5 g L^{-1}) and Mg^{2+} (0.12 g L^{-1}) (Belitz & Grosch, 1999). These are very important because they establish the physico-chemical stability of milk and can also be important, especially in the case of Ca^{2+} , in the growth and development of microorganisms (Veisseyre, 1988).

Capillary zone electrophoresis is one of the most powerful separation techniques for the analysis of a wide variety of sample matrices. The advantages of ion analysis using this technique include resolution, speed, simplicity and reduced sample preparation (Timerbaev, 2004). Although the determination of cations in milk samples is

widely described, by using other techniques like atomic absorption spectroscopy, very few applications of capillary electrophoresis to the analysis of metal ions in milk have been published.

Schmitt, Saulnier, Malhautier, and Linden (1993) determined cations by capillary electrophoresis in the soluble phase of milk with an ultrafiltration pre-treatment of the sample. Prestwell, McGaw, and Morrisson (1995) applied a capillary electrophoresis method for the separation and quantification of the major cations in an International Atomic Energy Agency Standard reference milk material. Paz, Rabanal, and Negro (1998) also proposed an electrophoretic method for the determination of cations in several samples, including whey samples obtained from skimmed milk; these whey samples were previously diluted and centrifuged.

Finally, Kuban, Odhoff, and Karlberg (1999) described an electrophoretic method for the determination of cations in milk samples based on electrokinetic injection. Validation was based on variations of nine consecutive injections of the same sample, and accuracy of this method for samples was not studied. Also, milk samples were subjected

*Corresponding author. Tel.: +34 981 594626; fax: +34 981 594912.
E-mail address: qnuidob@usc.es (J.F. Huidobro).

to a prior off-line dialysis; with this procedure, it was possible to remove casein micelles and also cations associated with them.

The objective of this study was to develop a rapid and reliable method for the determination of major cations in all phases of milk samples with a simple pre-treatment.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Analytical standard-grade potassium chloride, calcium nitrate, sodium chloride, magnesium nitrate, lithium chloride and imidazole were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Acetic acid and sodium hydroxide pellets were analytical-reagent grade and supplied by Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Stock standard solutions were obtained by dissolution of cations in purified water and stored at 4 °C. The water was purified by passage through a Ultra Pure Milli-Q plus water system from Millipore (Millipore, Milford, MA, USA).

2.2. Running solution and pH adjustment

Running solution contained 10 mmol L⁻¹ imidazole as the carrier solution and background absorbance provider. The pH was adjusted to 3.6 by adding 1 mol L⁻¹ acetic acid, which is also a complexing agent. This solution was freshly prepared and filtered through a 0.45 µm Phenomenex, AFO-0504 membrane (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

2.3. Apparatus

Separation of ions was carried out on a Waters Capillary Ion Analyser (CIA System, 1.3 version) equipped with a positive power supply and a UV detector with a 185 nm wavelength filter (Waters Associates Inc. Milford, MA, USA). Electropherograms were collected and plotted by the data acquisition system Millennium 2010 v. 2.15 with the specific option CIA for capillary zone electrophoresis. Fused-silica capillaries (Composite Metal Services LTD, UK) with 75 µm I.D. and 60 cm length were used. The distance from the point of injection to the window of on-column detection was 52.5 cm. A Crison micropH 2002 pH meter (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, Spain) and a Selecta Agimatic-S magnetic stirrer (Selecta, Abrera, Barcelona, Spain) were also used.

2.4. Electrophoretic procedures

Prior to use, new capillaries were treated with the following wash cycle: (i) 10 min with purified water, (ii) 10 min with 1 mol L⁻¹ NaOH, (iii) 10 min with 10 mmol L⁻¹ NaOH, (iv) 30 min with purified water and (v) 60 min with the background electrolyte. Steps (i) and (ii) were omitted for daily conditioning of the capillary

and, between injections, the capillary was washed with 2 min running electrolyte.

After all analyses on a day, the capillary was also washed with 10 mmol L⁻¹ NaOH (10 min) and purified water (30 min).

Injection was performed hydrostatically by elevating the sample at 10 cm for 30 s. The separation run carried out in 4 min with a constant voltage of +25 kV and at thermostated temperature of 25 °C. Indirect UV detection was achieved at 185 nm.

2.5. Samples

The proposed method was applied to the determination of main cations in 30 samples of commercial milk, purchased from a local supermarket. Ten samples were whole milk, 10 were low-fat and the last 10 were skimmed milk. For electrophoretic analysis, 0.4 mL of sample was diluted in 70 mL of purified water; then, the solution was adjusted to pH 4.0 with acetic acid, made up to 100 mL with purified water, filtered through a 0.45 µm membrane and injected directly in the capillary zone electrophoresis equipment.

All standards and milk samples were injected in triplicate. All statistical analyses (ANOVA and Student's *t*-test) were made with Statgraphics Plus for Windows 4.0 (1999).

3. Results

The proposed method allows the identification and quantification of K⁺, Ca²⁺, Na⁺ and Mg²⁺ in milk samples. These cations were identified by their relative migration times calculated as the ratio between their migration times and the migration time of Li⁺ used as reference compound (Fig. 1). This compound was added to all samples at a concentration of 0.1 g L⁻¹. These cations were quantified by using an external standard calibration with peak area.

3.1. Detection and quantification limits

The detection limit was calculated as $s_b + 3s$, and the quantification limit as $s_b + 10s$, where s_b is the average signal of 10 blank injections (absolute area value of each cation migration time $\pm 1\%$) and s the standard deviation (ACS Committee on Environmental Improvement, 1980). Table 1 shows detection and quantification limits of analysed cations. The detection limits ranged from 0.06 mg L⁻¹ for Mg²⁺ to 0.57 mg L⁻¹ for K⁺ and the quantification limits ranged from 0.16 mg L⁻¹ for Mg²⁺ to 0.62 mg L⁻¹ for K⁺.

3.2. Calibration curves

Calibration curves were determined for seven different concentrations of a mixture of cation standard solutions. Each calibration sample was injected in triplicate.

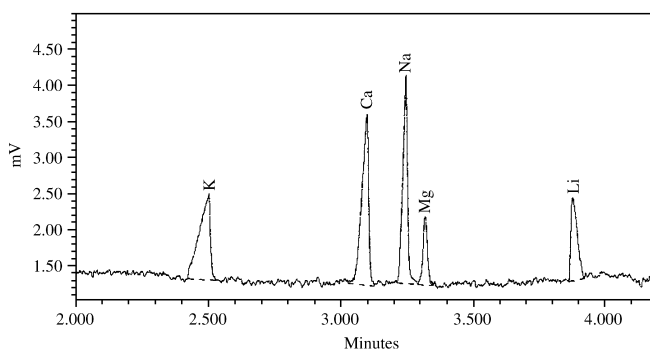


Fig. 1. Electrophoretogram of cations analysed by the proposed method in a whole milk sample. Li^+ was added as reference compound for the calculation of the relative migration times. (Conditions: 10 mmol L^{-1} imidazole, pH adjusted to 3.6 with 1 mol L^{-1} acetic acid, $+25 \text{ kV}$, 25°C , indirect UV detection at 185 nm).

Table 1

Detection and quantification limits of analysed cations (calculated as $s_b + 3$ and $s_b + 10$ s, respectively, where s_b is the average signal of 10 blank injections and s the standard deviation); parameters and correlation coefficients were obtained from the linear range of calibration plots with seven different concentrations of a mixture of cation standard solutions

Cation	Detection limit (mg L^{-1})	Quantification limit (mg L^{-1})	Calibration plots ^a		Correlation coefficient (r)	Linear range (g L^{-1})
			a	B		
K^+	0.57	0.62	253	−1155	0.9994	LOQ–10
Ca^{2+}	0.12	0.18	639	183	0.9998	LOQ–1.5
Na^+	0.12	0.17	681	175	0.9998	LOQ–1.5
Mg^{2+}	0.06	0.16	1319	166	0.9996	LOQ–1.5

LOQ: quantification limit.

^aCalibration plots are expressed as regression lines ($y = ax + b$), where y is the peak area and x is the amount in mg L^{-1} .

Plotting concentration against peak area and applying the least squares method obtained calibration graphs for each compound. Table 1 lists correlation coefficients of the calibration plots and linear range for analysed cations. Each plot was linear in a wide interval of quantification limits to 10 g L^{-1} for K^+ and 1.5 g L^{-1} for Ca^{2+} , Na^+ and Mg^{2+} .

3.3. Precision

The study comprised intraday and interday assays for three different milk samples (whole, low-fat and skim). The intraday analysis was established by the injection of the sample five times at the same day and the interday analysis was determined by analysing these three milk samples on three different days over about 1 month. Tables 2 and 3 show the precision results of the relative migration time and concentration for the milk samples analysed. The relative standard deviations (RSD%) of intraday and interday analysis were ≤ 4.0 and ≤ 4.1 for relative migration time and $\leq 1.8\%$ and $\leq 2.4\%$ for milk concentrations of cations, respectively.

3.4. Accuracy

The accuracy of the measurement of levels of cations was established using the method of standard additions to three milk samples (one whole milk sample, one low-fat sample and one skimmed milk). Three different amounts of each cation standards were added to equal amounts of milk sample and then diluted. Each assay was performed with three different quantities of standard solutions (0.2 , 0.4 and 0.6 g L^{-1} for K^+ and Ca^{2+} ; 0.05 , 0.1 and 0.2 g L^{-1} for Na^+ and 0.02 , 0.04 and 0.06 g L^{-1} for Mg^{2+}). Table 4 lists the percentage recoveries obtained for each cation in these three different milk samples; the mean values of recoveries ranged between 97.7% and 101.1% . To test whether there was a matrix effect (interferences caused by other components of the sample that can lead to obtain wrong results), the recovery assay must be analysed with different volumes of sample and regression analysis performed. If regression lines obtained from the comparison of recoveries were parallel, it could be concluded that there was no matrix effect. Thus, the samples were analysed with two different volumes and the parallel lines obtained were

Table 2

Precision analysis of migration times of analysed cations expressed as relative standard deviation (%) by the proposed method in three milk samples

Cation	Whole milk		Low-fat milk		Skim milk	
	Absolute migration time	Relative migration time	Absolute migration time	Relative migration time	Absolute migration time	Relative migration time
<i>Intraday (n = 5) (relative standard deviation in %)^a</i>						
K ⁺	4.0	2.4	3.1	2.4	5.8	4.0
Ca ²⁺	3.5	0.8	4.1	1.4	7.8	2.6
Na ⁺	5.3	1.2	4.3	1.2	7.9	2.0
Mg ²⁺	5.5	1.0	4.5	1.0	8.2	1.7
<i>Interday (n = 3) (relative standard deviation in %)</i>						
K ⁺	6.3	3.6	6.3	4.1	5.2	3.1
Ca ²⁺	8.9	2.6	8.0	2.3	3.3	2.3
Na ⁺	8.1	1.8	7.7	1.7	6.9	1.5
Mg ²⁺	8.3	1.6	8.7	1.7	7.1	1.3

^aThe intraday analysis was established by the injection of the sample five times at the same day and the interday analysis was determined by analysing milk samples on three different days over about one month. Li⁺ was used as a reference compound for the calculation of relative migration time.

Table 3

Precision of the measurement of concentration of analysed cations expressed as relative standard deviation (%) by the proposed method in three milk samples (one whole milk, one low-fat and one skimmed milk)

Cation	Whole milk	Low-fat milk	Skim milk
<i>Intraday (n = 5) (relative standard deviation in %)^a</i>			
K ⁺	0.6	0.7	0.5
Ca ²⁺	0.7	0.7	0.4
Na ⁺	0.6	0.7	0.5
Mg ²⁺	0.7	0.7	1.8
<i>Interday (n = 3) (relative standard deviation in %)</i>			
K ⁺	0.8	0.8	0.7
Ca ²⁺	0.9	0.8	0.5
Na ⁺	0.8	1.0	0.5
Mg ²⁺	1.0	0.7	2.4

^aThe intraday analysis was established by the injection of each sample five times at the same day and the interday analysis was determined by analysing milk samples on three different days over about one month. Means and standard deviations of cation concentrations (g L⁻¹) of milk samples obtained were used for the calculation of relative standard deviations.

tested by analysing the slopes of the regression lines with an ANOVA test. Because the *p*-value for the slopes is greater than 0.05 (Table 4), there were no significant differences among the slopes for the various volumes of sample at the 95% or higher confidence level. Therefore, it was concluded that there was not a matrix effect for the determination of cations in milk samples by the proposed method.

3.5. Content of major cations in milk samples analysed

Table 5 shows the content of cations in the 30 milk samples analysed (10 samples were whole milk, 10 were low-fat and the remainder were skimmed milk) and Fig. 1 presents an electrophoretogram of a whole milk sample. In

these samples, mean levels of 1.46, 1.19, 0.505 and 0.126 g L⁻¹ for K⁺, Ca²⁺, Na⁺ and Mg²⁺, respectively, were obtained. Data shown in this work are similar to results from Belitz and Grosch (1999) that summarise data obtained with reference methods.

4. Discussion

4.1. Absolute and relative migration times

When a capillary electrophoresis method is developed, a common problem is the fluctuation of the absolute migration times (Yang, Bose, & Hage, 1996). These variations could be related to variations in the electro-osmotic flow, which is affected by different parameters, such as running buffer composition, applied voltage and/or temperature. The use of relative migration times with respect to a reference compound is a possible solution to reduce this variation (Jones, 1993). The use of relative migration times indeed made the proposed method more robust (Table 2). Li⁺ was used as a reference compound for the identification of cations because it was not present in milk samples at the detection limit of this method; this cation has been previously used as a reference compound for the determination of small inorganic cations in samples such as milk or blood plasma (Kuban et al., 1999).

4.2. Importance of sample pre-treatment

Firstly, analysis of milk samples was performed without any sample pre-treatment other than dilution and filtration. Although these analyses showed precise and accurate results, data were different from those obtained by reference methods. We also noticed that, when samples were analysed in this way, the most significant variability was in Ca²⁺ content. In the 30 samples analysed, the mean level for Ca²⁺ obtained without a sample treatment was 0.79 g L⁻¹ and the usual content of Ca²⁺ in these kind of

Table 4

Recoveries (%) obtained by the method of standard additions for analysed cations (different known amounts of each cation standards were added to equal volumes of each sample and then diluted to the same volume) and *p*-value from ANOVA test for the comparison of the slopes of regression lines obtained

Cation	Whole milk		Low-fat milk		Skim milk	
	Mean \pm SD ^a	<i>p</i> -Value	Mean \pm SD	<i>p</i> -Value	Mean \pm SD	<i>p</i> -Value
K ⁺	99.5 \pm 1.64	0.9529	99.0 \pm 2.13	0.9719	99.7 \pm 1.72	0.6989
Ca ²⁺	101.1 \pm 1.37	0.6888	98.6 \pm 2.27	0.5700	99.5 \pm 1.33	0.3620
Na ⁺	100.8 \pm 0.86	0.5020	97.7 \pm 1.56	0.8815	100.3 \pm 0.85	0.2257
Mg ²⁺	99.1 \pm 1.08	0.1489	98.1 \pm 3.22	0.4918	99.5 \pm 2.03	0.5343

^aSD: Standard deviation.

Table 5

Content of cations (g L⁻¹) of milk samples (10 each of whole, low-fat and skimmed milk) as determined by the method developed in this study

	Cation (g L ⁻¹)			
	K ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺
Mean (<i>N</i> = 30)	1.46	1.19	0.50	0.126
Standard deviation	0.07	0.06	0.04	0.008
<i>V</i> _{min}	1.35	1.09	0.43	0.112
<i>V</i> _{max}	1.63	1.32	0.59	0.145

samples is 1.2 g L⁻¹ (Belitz & Grosch, 1999). This could be explained because Ca²⁺ is found in milk samples in three forms: as soluble ions, as weak salts or associated with casein micelles (Veisseyre, 1988). When a direct analysis (with only a dilution and filtration) is carried out, the Ca²⁺ content inside of casein micelles cannot be analysed.

One way for determining free cations in samples could be acidification to a pH lower than the isoelectric point of casein (4.6) (Le Graet & Gaucheron, 1999; Veisseyre, 1988). Under these conditions, the colloidal solution of calcium phosphocaseinate is sensitive to the acidic pH and neutralisation of the negative charges of the micelle occurs. In addition, the affinity of the acid solution to water may cause the dehydration of some micelles (Le Graet & Gaucheron, 1999; Veisseyre, 1988). These two phenomena flocculate the colloidal solution as the casein without minerals. In the acidification process, there is a progressive migration of Ca²⁺ outside the micelles (Le Graet & Gaucheron, 1999; Veisseyre, 1988). Therefore, the complete determination of Ca²⁺ could be obtained with the acidification of the sample to pH value lower than 4.6. A pH value of 4.0 was selected to ensure that all Ca²⁺ ions were in solution.

As shown in Table 6, there were differences between Ca²⁺ content in milk samples analysed when preliminary sample preparation procedure was used. A statistical analysis (Student's *t*-test assuming equal variances) was performed to prove that the sample treatment is necessary. A *t*-value of -9.668 with a *p*-value of 0.0000 was obtained. Thus, there are statistically significant differences between

Table 6

t-Student analysis of the content of Ca²⁺ (mean values in g L⁻¹) of samples studied with and without previous sample treatment

	Ca ²⁺ (g L ⁻¹)		
	Mean	Range	Reference value (Belitz & Grosch, 1999)
Without sample treatment	0.79	0.46–1.22	1.20
With sample treatment	1.19	1.09–1.32	
<i>t</i> -Student analysis (assuming equal variances): <i>t</i> = -9.66825			
<i>P</i> -value = 0.00000216367			

Ca²⁺ contents obtained with and without the sample treatment, at the 99.9% confidence level and sample pre-treatment was clearly important in accurately determining free cation contents of milk samples.

4.3. Quantity of sample to be analysed

In order to select the quantity of milk sample used to optimise sensitivity, dilutions from $\frac{1}{200}$ to $\frac{1}{1000}$ of milk samples were tested. When the concentration of sample increased, the concentration of cations also increased, except for Ca²⁺ content. In this case, Ca²⁺ content increased until the limit of dilution, $\frac{1}{250}$, where there was a maximum and, then, it decreased. This phenomenon could be explained by the existence of a limit of concentration in which the dissociation of micelles was complete. For this reason, a dilution of $\frac{1}{250}$ was selected as the sample concentration.

5. Conclusions

A reliable, rapid and simple capillary zone electrophoresis method for the determination of cations K⁺, Ca²⁺, Na⁺ and Mg²⁺ in milk samples was developed. Complete separation of major cations can be accomplished in 4 min with 10 mmol L⁻¹ imidazole as the background electrolyte

and 1 mol L^{-1} acetic acid as the complexing agent and to adjust the pH to 3.6. The operating voltage was +25 kV at 25 °C. The content of the main cations in milk samples was determined with a simple but essential previous treatment (acidification at pH 4.0 with 1 mol L^{-1} acetic acid and filtration). This method is potentially interesting for carrying out routine analysis of main cations in milk samples.

Acknowledgements

We thank Professor Rafael Cela Torrijos of the Analytical Chemistry Department of the Chemistry Faculty and Professor José Luis Rodríguez Otero of the Food Analysis and Research Institute of the Veterinary Faculty, both of University of Santiago de Compostela, for their helpful comments.

References

- ACS Committee on Environmental Improvement. (1980). Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical Chemistry*, 52, 2242–2249.
- Belitz, H. D., & Grosch, W. (1999). *Food chemistry*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer.
- Jones, W. R. (1993). Method development approaches for capillary ion electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 640, 387–395.
- Kuban, P., Odhoff, O., & Karlberg, B. (1999). Direct determination of small cations in proteinaceous samples using a flow injection–capillary electrophoresis system. *Journal of Chromatography A*, 857, 321–326.
- Le Graet, Y., & Gaucheron, F. (1999). pH-induced solubilization of minerals from casein micelles: Influence of casein concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research*, 66, 215–224.
- Paz, E., Rabanal, B., & Negro, A. (1998). Determination of cations in water and biological fluids by capillary zone electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 21, 2589–2605.
- Prestwell, E. L., McGaw, B. A., & Morrisson, A. R. (1995). The comparison of capillary zone electrophoresis and atomic spectroscopy for the determination of the cation content of a standard reference material IAEA-A-11 milk powder. *Talanta*, 42, 283–289.
- Schmitt, M., Saulnier, F., Malhautier, L., & Linden, G. (1993). Effect of temperature on the salt balance of milk studied by capillary ion electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 640, 419–424.
- Statgraphics Plus for Windows 4.0. (1999). Statistical Graphics Corp.
- Timerbaev, A. R. (2004). Capillary electrophoresis of inorganic ions: an update. *Electrophoresis*, 25, 4008–4031.
- Veisseyre, R. (1988). *Lactología Técnica*. Zaragoza, Spain: Acribia, S.A.
- Yang, J., Bose, S., & Hage, D. S. (1996). Improved reproducibility in capillary electrophoresis through the use of mobility and migration time ratios. *Journal of Chromatography A*, 735, 209–220.



ANEXO IV

Método de electroforesis capilar para la determinación de aniones inorgánicos y ácido fórmico en miel

Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006, 54, 9292-9296



Capillary Zone Electrophoresis Method for the Determination of Inorganic Anions and Formic Acid in Honey

SILVIA SUÁREZ-LUQUE,[†] INÉS MATO,[†] JOSÉ F. HUIDOBRO,^{*,†}JESÚS SIMAL-LOZANO,[†] AND M. TERESA SANCHO[§]

Facultad de Farmacia, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Área de Nutrición y Bromatología, Universidad de Santiago, 15782 Santiago de Compostela, Galicia, Spain, and Facultad de Ciencias, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Área de Nutrición y Bromatología, Universidad de Burgos, Plaza de Misael Bañuelos García s/n, 09001 Burgos, Castilla y León, Spain

A capillary zone electrophoresis method for the determination of inorganic anions and formic acid in honey samples was developed for the first time. The complete separation of chloride, nitrate, sulfate, phosphate, and formic acid was achieved with a simple electrolyte composed by 2 mM potassium dichromate as the carrier solution and background absorbance provider and 0.05 mM tetraethylenepentamine (TEPA) as electro-osmotic flow suppressor (pH 4.00). Injection was performed hydrostatically by elevating the sample at 10 cm for 10 s. The running voltage was -27 kV at 25°C . Indirect UV absorption detection was achieved at 254 nm. The detection limit was in the range between 0.03 and 20 mg/kg, and the quantification limits ranged from 1.52 to 20.6 mg/kg. The calibration graphs were linear in the concentration range from the quantification limit to at least 2.5 g/kg for chloride, 0.25 g/kg for nitrate, 0.75 g/kg for sulfate, 1.50 g/kg for phosphate, and 0.75 g/kg for formic acid. Precision data in the honey samples analyzed showed repeatability and reproducibility relative standard deviations lower than 1.4 and 2.4% for migration time and lower than 1.8 and 4.3% for anion content, respectively. Recoveries of anions in honey samples analyzed ranged from 94.4 to 99.8%. Ten honey samples were analyzed to test the proposed method. Mean contents of 260.5, 3.93, 60.5, 139.4, and 209.3 mg/kg were found, respectively, for chloride, nitrate, sulfate, phosphate, and formic acid in analyzed honeys. These results agreed with literature data.

KEYWORDS: Anions; capillary zone electrophoresis; honey

INTRODUCTION

Honey is one of the most complex foodstuffs produced by nature and certainly the only sweetening agent that can be used by humans without processing (1). The mineral content of honey samples could give an indication of environmental pollution and herewith also an indication of the geographical origin of honey (2). Inorganic anions are related to conductivity of honeys, and this parameter is regulated in the quality control of honey samples. Formic acid is important due to its efficacy against *Varroa* infestation, similar to other widely used chemicals such as fluvalinate (3). However, formic acid is very volatile, and it is toxic when inhaled, so it is important to have analytical methodology available for its determination (4).

Some authors have previously determined anions in honey samples by different procedures. Ehrhardt and Liebig (5) analyzed some minerals by compleximetry and gravimetry including chloride and phosphate, after desiccation of the

samples. Chlorides were determined by potentiometric titration of a solution of honey by a mercurimetric volumetry (6) or with a silver nitrate solution (7). Phosphorus was analyzed by a vanadomolybdate colorimetry of phosphate (6, 7). Sulfur determination consisted of a turbidimetry of barium sulfate (6, 7). The simultaneous determination of anions in honey was carried out according to two procedures: ion chromatography (8–11) and inductively plasma coupled spectrometry (12–16). With regard to inductively plasma coupled spectrometry, all methods needed a previous treatment of the samples, such as digestion, mineralization, or calcination, thus making the determinations long and tedious. Ion chromatography seemed to be a good alternative for the determination of anions in honey samples, but one of the published methods needed a previous solid-phase extraction procedure on anionic cartridges (10) and the other two methods published were not validated (9, 11). Besides, two of these methods (10, 11) determined only nitrate and sulfate anions.

In relation to formic acid, several authors have developed enzymatic methods for its determination in honey samples (17–21). It was also determined by ionic chromatography with a

* Corresponding author (fax +34 981 594912; e-mail qnhuidob@usc.es).

[†] Universidad de Santiago.

[§] Universidad de Burgos.

conductivity detector (22), by HPLC (23–25), and by capillary zone electrophoresis (CZE) simultaneously with other organic acids (26).

Capillary zone electrophoresis is one of the more powerful separation techniques for the analysis of a wide variety of sample matrices. The advantages of ion analysis using this technique include resolution, speed, simplicity, and reduced sample preparation (27).

For these reasons, the aim of this work was the development of a CZE method for the simultaneous determination of the main inorganic anions in honey samples.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Analytical standard grade chloride, nitrate, sulfate, phosphate, formic acid, potassium dichromate, and tetraethylenepentamine (TEPA) were obtained from Sigma. Stock standard solutions were obtained by dissolution of anions in purified water and stored at 4 °C. The water was purified by passage through an ultrapure water system Milli-Q Plus from Millipore.

Apparatus. Separation was carried out on a Waters capillary ion analyzer (CIA System, 1.3 version) equipped with a negative power supply and a UV detector with a 254 nm wavelength filter. Fused-silica capillaries of 75 μm i.d. and 60 cm in length were used. The distance from the point of injection to the window of on-column detection was 52.5 cm. Electropherograms were collected and plotted by the data acquisition system Millennium 2010 v. 2.15 with specific option CIA for capillary electrophoresis (Waters Associates, Inc., Milford, MA). A Crison micropH 2002 pH-meter (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, Spain) and a Selecta Agimatic-S magnetic stirrer (Selecta, Abrera, Barcelona, Spain) were also used. The electrolyte was filtered with membrane filters Phenomenex 0.45 μm , AFO-0504 (Phenomenex, CA).

Electrophoretic Procedures. Prior to use, new capillaries were treated with the following wash cycle: (i) 10 min with purified water, (ii) 10 min with 1 M NaOH, (iii) 10 min with 10 mM NaOH, (iv) 30 min with purified water, and (v) 60 min with the background electrolyte. Steps i and ii were omitted for daily conditioning of the capillary and, between injections, the capillary was washed for 2 min with running electrolyte.

After all analyses of the day, the capillary was also washed with 10 mM NaOH (10 min) and purified water (30 min).

Running buffer contained 2 mM potassium dichromate as the carrier buffer and background absorbance provider and 0.05 mM TEPA as flow modifier (pH 4.00). The buffer solution was freshly prepared and filtered through a 0.45 μm membrane.

Sample injection was carried out in a hydrodynamic mode by elevating the sample at 10 cm during 10 s. The separation run was at a constant voltage of -27 kV at 25 °C, and it is achieved in 12 min. Indirect UV detection was achieved at 254 nm.

Samples. This work was carried out on 10 samples from Galicia (northwestern Spain) labeled as "Indicación Xeográfica Protexida-Mel de Galicia". The samples were stored in darkness at room temperature until analysis. The botanical origin of the samples was determined after treating and dyeing the sediment (28, 29). Three samples were *Castanea sativa* Miller honeys, four samples were *Eucalyptus* sp. honeys, and three samples were multifloral honeys.

Sample Treatment. For the electrophoretic analysis 1 g of honey was dissolved in 10 mL of purified water, filtered through a 0.45 μm membrane, and injected directly without any other sample treatment.

All standards and samples were injected in triplicate. All statistical analysis was made with Statgraphics (30).

RESULTS AND DISCUSSION

The proposed method allows the identification and quantification of chloride, nitrate, sulfate, and phosphate in honey samples. We can also determine formic acid simultaneously.

Table 1. Detection and Quantification Limits, Parameters, and Correlation Coefficients (R) of Calibration Plots of Analyzed Anions^a

anion	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	calibration plots		
			a	b	R
chloride	20.0	20.6	23.4	-446	0.9995
nitrate	0.03	1.52	21.3	31.3	0.9997
sulfate	1.3	3.0	23.3	11.2	0.9995
phosphate	0.5	5.0	58.7	184	0.9998
formic acid	2.5	6.6	38.9	4.2	0.9998

^a Calibration plots are expressed as regression lines ($y = ax + b$), where y is the peak area and x is the amount in mg/kg.

These anions were identified by their migration times, and they were quantified by using an external standard calibration with peak area.

Background Electrolyte. Dichromate and phthalate were tested as background electrolyte; dichromate was selected because the best results were obtained with this compound and, also, it is a good chromophore, widely used for anion determinations (31) and available for working at low pH.

The major problem for the separation of anions in honey is that the analytes are minor components in the presence of a large amount of organic compounds that can disturb the chemical equilibrium and affect the separation. One solution to this problem is converting all analytes into the anionic form and separating them under a suitable suppression of the electroosmotic flow (EOF) and setting the polarity of the driving high voltage in such a way that the anions will move into the column after injection in the opposite direction to the EOF, neutral compounds will not move, and cations will move away, thus not causing interference with the separation of the organic and inorganic anions. Alkyl amines were found to be able to suppress EOF at different degrees, TEPA being one of the most effective (32).

For these reasons TEPA was selected as EOF. This compound was previously used for the determination of organic and inorganic anions in Chinese traditional herbs (32). The effect of TEPA concentration was tested in the 0.05–0.25 mM range. We observed that the greater the concentration of TEPA was, the higher the migration times were and the poorer the baseline of the electropherogram was. Therefore, a 0.05 mM concentration of TEPA was selected.

Detection and Quantification Limits. The detection limit was calculated as $s_b + 3s$, where s_b is the average signal of 10 blank injections (absolute area value of each anion migration time $\pm 1\%$) and s the standard deviation. The quantification limit was calculated as $s_b + 10s$, where s_b is the average signal of 10 blank injections and s the standard deviation (33). **Table 1** shows detection and quantification limits of the analyzed anions. The detection limit was in the range between 0.03 and 20 mg/kg, and the quantification limits ranged from 1.52 to 20.6 mg/kg.

Calibration Curves. Calibration curves were determined for seven different concentrations of a mixture of anion standard solutions. Each calibration sample was injected in triplicate. Plotting peak area against concentration and applying the least-squares method, we obtained calibration graphs for each compound. Each plot was linear in a wide interval from quantification limit to at least 2.5 g/kg for chloride, 0.25 g/kg for nitrate, 0.75 g/kg for sulfate, 1.50 g/kg for phosphate, and 0.75 g/kg for formic acid, with correlation coefficients >0.9995 . **Table 1** lists correlation coefficients and parameters of the calibration plots for the analyzed anions.

Table 2. Precision of the Proposed Method for the Determination of Anions in Honey Samples

anion	sample A		sample B	
	migration time	content	migration time	content
Repeatability ($n = 5$)				
chloride	0.1	1.8	0.3	0.3
nitrate	0.1	1.6	0.3	0.8
sulfate	0.5	1.2	0.7	0.2
phosphate	0.3	1.4	0.8	0.3
formic acid	1.4	1.2	1.2	0.4
Reproducibility ($n = 3$)				
chloride	0.5	3.5	0.4	0.3
nitrate	0.6	1.9	0.4	1.9
sulfate	1.4	1.5	1.3	0.3
phosphate	2.4	1.8	1.1	0.3
formic acid	1.9	4.3	0.5	0.4

Table 3. Recoveries of Analyzed Anions Obtained with the Method of Standard Additions and p Values from ANOVA Test for Comparison of the Slopes of Regression Lines Obtained When the Matrix Effect Was Studied

anion	recovery (%) \pm SD	p value
chloride	94.4 \pm 9.6	0.9935
nitrate	97.1 \pm 3.1	0.2422
sulfate	98.8 \pm 1.2	0.8692
phosphate	99.8 \pm 0.4	0.1285
formic acid	97.4 \pm 2.8	0.7003

Quantity of Sample and Hydrodynamic Injection Time.

We did a study by modifying the dilution of the honey samples (from 1:10 to 1:40) and the hydrodynamic injection time (from 10 to 30 s), and the best response was obtained with the combination of dilution 1:10 and 10 s of injection time.

Precision. The precision study was established in two honey samples and included repeatability and reproducibility. The repeatability was established by injecting five times the same honey on the same day. The reproducibility analysis was determined by analyzing each sample of honey on three different days over about 1 month. **Table 2** shows data obtained (RSD %) in this study. Results were lower than 1.4% for migration time and 1.8% for anion content (milligrams per kilogram) in repeatability analysis and lower than 2.4% for migration time and 4.3% for anion content (milligrams per kilogram) in reproducibility analysis.

Recovery. We established the accuracy of the anion analysis in two honey samples by using the method of standard additions. Three different amounts of each anion standards were added to equal amounts of honey sample and then diluted to the same volume. Each assay was made with three different quantities of standard solutions. **Table 3** lists the percentage of recoveries obtained for each compound (mean of two samples studied \pm standard deviation). Furthermore, to test whether there was a matrix effect, the recovery assay should be analyzed with different amounts of sample. If regression lines obtained from the comparison of recoveries were parallel, we could conclude that there was not a matrix effect. A honey sample at two different concentrations was analyzed, and parallel lines were tested with the analysis of the slopes of the regression lines with an ANOVA test. If the p value for the slopes was >0.10 (**Table 3**), there were no statistically significant differences between the slopes for the different concentrations of sample at the 90% or higher confidence level. Therefore, there was not a matrix effect for the determination of inorganic anions and formic acid in honey samples with the proposed method.

Table 4. Content of Anions in Analyzed Honeys from Different Botanical Origins

sample	honey botanical origin	anion (mg/kg)				
		chloride	nitrate	sulfate	phosphate	formic acid
1	<i>Castanea sativa</i> Miller	106	2.4	75	195	199
2	<i>Castanea sativa</i> Miller	57	NQ ^a	152	127	506
3	<i>Castanea sativa</i> Miller	69	9.0	173	628	412
4	<i>Eucalyptus</i> sp.	490	4.8	8	21	50
5	<i>Eucalyptus</i> sp.	287	3.3	11	30	126
6	<i>Eucalyptus</i> sp.	311	2.8	17	31	128
7	<i>Eucalyptus</i> sp.	456	6.7	23	35	74
8	multifloral	282	2.9	51	129	203
9	multifloral	288	3.3	48	107	186
10	multifloral	259	2.6	47	91	209
mean		260.5	3.93	60.5	139.4	209.3
SD		148.1	2.3	57.9	180.8	144.2
V_{\min}		57	NQ	8	21	50
V_{\max}		490	9.0	173	628	506

^a Not quantifiable.

Table 5. Anion Contents Obtained by Other Authors

ref	anion (mg/kg)				
	chloride	nitrate	sulfate	phosphate	formic acid
6 ^a	262 (43–507) ^b		138 (12–243)	239 (31–653)	
7	303 (77–579)		40 (19–130)	119 (36–350)	
8 ^a	833		114	702	
9	178 (27–634)	12 (2–101)	52 (10–262)	64 (13–208)	
10		1.7 (0.5–7.3)	86 (20–206)		
12 ^a			146 (93–198)	287 (113–460)	
13 ^a				234 (74–847)	
14 ^a			87 (6–354)	310 (98–1220)	
15 ^a			87 (57–129)	156 (80–294)	
16 ^a				312 (157–473)	
17					216 (56–626)
19 ^a					166 (41–428)
20					168 (34–340)
21					(17–284)
22					181 (5–1342)
23					108 (30–236)
24					58 (5–347)
25					180 (46–567)
26					266.4 (46–908)

^a Data of these references have been converted (sulfur into sulfate and phosphorus into phosphate) in order to have comparable results. ^b Mean (V_{\min} – V_{\max}).

Content of Anions of Honeys Analyzed. Anion content of the studied honeys is shown in **Table 4**. A great variability in the quantitative composition of anions was found in honeys. In *Castanea sativa* Miller honeys, we found low levels of chloride and high levels of sulfate, phosphate, and formic acid. Conversely, *Eucalyptus* sp. honeys had high levels of chloride and the lowest levels of sulfate, phosphate, and formic acid. These results show that anions analysis could be potentially useful to characterize different honeys depending on their botanical origin. As can be seen in **Table 4**, chloride shows the highest levels and nitrate the lowest levels. These results are consistent with data obtained by other authors (**Table 5**). **Figure 1** shows two electropherograms of two of these honeys, where the great variability found in the quantitative composition of anions in the analyzed honeys is evident.

In conclusion, the proposed method allows, for the first time, the separation and quantification of anions chloride, nitrate, sulfate, phosphate, and formic acid in honey samples by capillary electrophoresis. The optimized electrophoretic procedure is

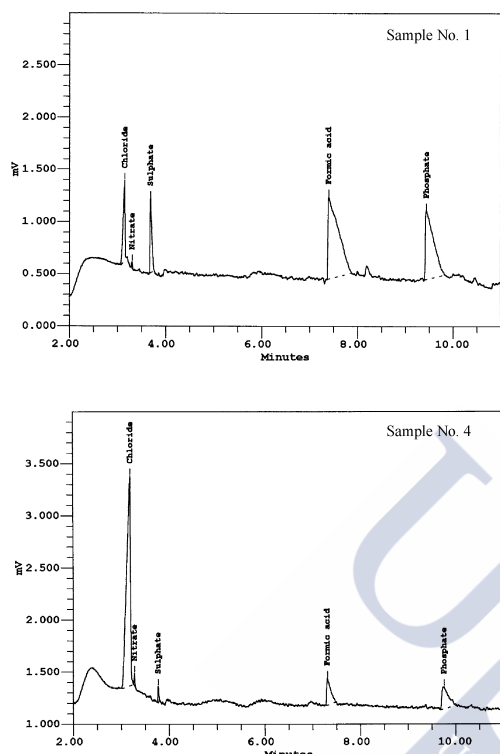


Figure 1. Electropherograms of analyzed anions by the proposed method in a *Castanea sativa* Miller honey (sample 1) and in a *Eucalyptus* sp. honey (sample 4).

simple and does not need any preparation of sample other than dilution and filtration. In addition, anions analysis has proved to be potentially useful for unifloral honey characterization.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Professor Rafael Cela Torrijos of the Analytical Chemistry Department of the Chemistry Faculty and Professor Juan Carlos García Monteagudo of the Chemistry–Physics Department of the Pharmacy Faculty, both of the University of Santiago de Compostela, for helpful comments. We thank all of the beekeepers that provided the “Indicación Xeográfica Protexida-Mel de Galicia” honey samples for this study.

LITERATURE CITED

- (1) Terrab, A.; Recamales, A. F.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J. Contribution to the study of avocado honeys by their mineral contents using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Food Chem.* **2005**, *92*, 305–309.
- (2) Anklam, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* **1998**, *63*, 549–562.
- (3) Mato, I.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J.; Sancho, M. T. Significance of nonaromatic organic acids in honey. *J. Food Prot.* **2003**, *66*, 2371–2376.
- (4) Kochansky, J.; Shimanuki, H. Development of a gel formulation of formic acid for control of parasitic mites of honey bees. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3850–3853.
- (5) Ehrhardt, P.; Liebig, J. Inorganic constituents of the honey-dew of *Megoura vicia*. *Experientia* **1965**, *21*, 472–473.
- (6) Rodríguez-Otero, J. L.; Paseiro, P.; Simal, J.; Terradillos, L.; Cepeda, A. Silicon, phosphorus, sulphur, chlorine and ash contents of Spanish commercial honeys. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, *200*, 233–234.
- (7) González-Paramás, A. M.; Báñez, J. A. G.; García-Villanova, R. J.; Pala, T. R.; Albajar, R. A.; Sánchez, J. S. Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 157–165.
- (8) Pérez-Cerrada, M.; Herrero-Villén, M. A.; Maquieira, A. Sugar-rich food: determination of inorganic anions by ionic chromatography. *Food Chem.* **1989**, *34*, 285–294.
- (9) Poiana, M.; Fuda, S.; Manzi, E.; Postorino, S.; Mincione, B. Research on commercial honeys in Italy—mineral fraction. *Ind. Aliment.* **1996**, *35*, 522–530.
- (10) Del Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Diego, J. C.; Gómez, L. A.; Ruiz, J. M.; Higes, M. Determination of oxalate, sulfate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography. *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 629–638.
- (11) Radovic, B. S.; White, R.; Parker, I.; Dennis, M. J.; Sharman, M.; Geiss, H.; Anklam, E. Contribution of high temperature gas chromatographic analysis of oligosaccharides and ion chromatographic analysis of various cations and anions to authenticity testing of honey. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **2001**, *97*, 380–384.
- (12) Merin, U.; Bernstein, S.; Rosenthal, I. A parameter for quality of honey. *Food Chem.* **1998**, *63*, 241–242.
- (13) Sager, M.; Pechhacker, H.; Pechhacker, M. Trace elements in honey. *Chem. Ind. Ecol.* **2002**, *9*, 461–472.
- (14) Devillers, J.; Dore, J. C.; Marengo, M.; Poirier-Duchene, F.; Galand, N.; Viel, C. Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honeys sold in France. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5998–6007.
- (15) Terrab, A.; Recamales, A. F.; Herranz, D.; Heredia, F. J. Characterisation of Spanish thyme honeys by their physico-chemical characteristics and mineral contents. *Food Chem.* **2004**, *88*, 537–542.
- (16) Fernández-Torres, R.; Pérez-Bernal, J. L.; Bello-López, M. A.; Callejón-Mochón, M.; Jiménez-Sánchez, J. C.; Guiraum-Pérez, A. Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta* **2005**, *65*, 686–691.
- (17) Stoya, W.; Wachendoerfer, G.; Kary, I.; Siebentritt, P.; Kaiser, E. Formic acid as a therapeutic against varroa and its effect on honey. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **1986**, *82*, 217–221.
- (18) Hansen, H.; Guldborg, M. Residues in honey and wax after treatment of bee colonies with formic acid. *Tidsskr. Planteavl.* **1988**, *92*, 7–10.
- (19) Talpay, B. Inhaltsstoffe des Honigs-Ameisensäure (Formiat). *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **1989**, *85*, 143–147.
- (20) Sabatini, A. G.; Marazzan, G. L.; Colombo, R.; Garagnani, M. Applicazione di un metodo enzimatico per la determinazione dell'acido formico e dell'acido lattico presenti nel miele. *Apicoltura* **1994**, *9*, 135–145.
- (21) Bogdanov, S.; Charrière, J. D.; Imdorf, A.; Kilchenmann, V.; Fluri, P. Determination of residues in honey after treatments with formic and oxalic acid under field conditions. *Apidologie* **2002**, *33*, 399–409.
- (22) Defilippi, A.; Piancone, G.; Prandatter, A.; Tibaldi, G. P. Honey quality: Ion chromatographic determination of formic acid. *Ind. Aliment.* **1995**, *34*, 495–497, 503.
- (23) Del Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Marinero, P.; Diego, J. C.; Frechilla, J. I.; Higes, M.; Llorente, J. High performance liquid chromatographic determination of organic acids in honeys from different botanical origin. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1998**, *21*, 3197–3214.
- (24) Alamanni, M. C.; Cossu, M.; Sanna, F. Un metodo HPLC per il dosaggio degli acidi ossalico, lattico e formico quali acaricidi e componenti naturali nel miele. *Riv. Sci. Aliment.* **2000**, *29*, 139–147.

- (25) Del Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Diego, J. C.; Gómez, L. A.; Higes, M. HPLC determination of low molecular weight organic acids in honey with series-coupled ion-exclusion columns. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, *26*, 1231–1253.
- (26) Mato, I.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J.; Sancho, M. T. Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1541–1550.
- (27) Timerbaev, A. R. Capillary electrophoresis of inorganic ions: an update. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 4008–4031.
- (28) Louveaux, J.; Maurizio, A.; Vorwohl, G. Methods of melissopalynology. *Bee World* **1978**, *59*, 139–157.
- (29) Terradillos, L. A.; Muniategui, S.; Sancho, M. T.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J. An alternative method for analysis of honey sediment. *Bee Sci.* **1994**, *3*, 86–93.
- (30) *Statgraphics Plus for Windows 4.0*; Statistical Graphics Corp.: 1999.
- (31) Galli, V.; García, A.; Saavedra, L.; Barbas, C. Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 1951–1981.
- (32) Fung, Y.-S.; Tung, H.-S. Application of capillary electrophoresis for organic acid analysis in herbal studies. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2242–2250.
- (33) ACS Committee on Environmental Improvement. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 2242–2249.

Received for review June 1, 2006. Revised manuscript received October 8, 2006. Accepted October 9, 2006.

JF061536S

